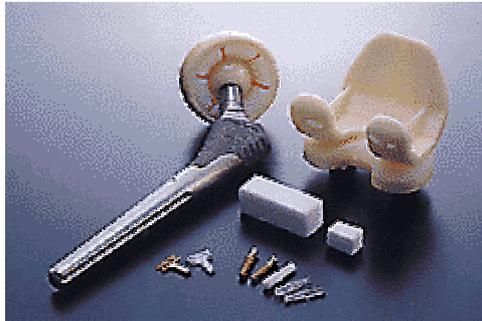


APOSTILA DE BIOMATERIAIS



Marcelo Henrique Prado da Silva

I INTRODUÇÃO

A perda de um órgão ou de uma parte do corpo gera, além da perda da função, transtornos sociais e psicológicos. Os avanços alcançados na medicina e odontologia modernas, aliados ao aumento da expectativa de vida, têm possibilitado o desenvolvimento de técnicas que geram uma melhor qualidade de vida. A disponibilização dessas técnicas tem oferecido novas opções aos pacientes mutilados, como a substituição total ou parcial de ossos fraturados por implantes. Essa tendência tem sido observada principalmente na implantodontia, onde pacientes edêntulos (com perda de dentes) têm optado, cada vez mais, pela utilização de implantes odontológicos, ao invés das antigas próteses removíveis.

O desenvolvimento da implantologia tem dado incentivo à pesquisa de biomateriais para esse fim, bem como das reações que ocorrem na interface tecido-implante. Inicialmente utilizavam-se materiais inertes como os aços inoxidáveis e a alumina. Nos anos 70, Per-Ingvar Brånemark introduziu o conceito de osteointegração como sendo a ligação direta, estrutural e funcional entre osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeito a cargas funcionais (BRANEMARK, 1985). Com a introdução desse conceito, as pesquisas passaram a se concentrar em materiais e projetos, visando acelerar a osteointegração, ou seja, diminuir o tempo necessário para a aposição óssea.

Recentemente, a otimização das propriedades de superfície como grau de pureza, acabamento superficial, rugosidade e molhabilidade tem sido explorado. Alterações na camada de óxido de metais como o titânio também têm sido bastante investigadas e, paralelamente, técnicas de recobrimento com materiais bioativos têm sido desenvolvidas. Dentre os materiais bioativos, a hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ se destaca pela sua semelhança com os fosfatos de cálcio presentes na fase mineral do osso.

Várias técnicas de avaliação da adequação de um novo material para aplicações biomédicas têm sido desenvolvidas numa tentativa de simular o desempenho do material após sua inserção no corpo humano. Essas técnicas compreendem testes *in vitro* e testes *in vivo*. Para testes *in vitro*, são utilizados normalmente testes de bioatividade em líquido corporal simulado e estudos em cultura de células. Os estudos em cultura de células normalmente compreendem testes de citotoxicidade, medições

bioquímicas de atividade celular, avaliação de proliferação, crescimento e morfologia celular.

II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 BIOMATERIAIS

Os biomateriais são usados em dispositivos médicos, sobretudo naqueles que são temporária ou permanentemente implantados no corpo humano. O termo biomaterial foi definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde em 1982 como:

“Qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (HELMUS E TWEDEN, 1995).

O critério de seleção de biomateriais é baseado principalmente na aplicação a que se destinam. Por exemplo, para dispositivos que fiquem em contato com o sangue, esses materiais são:

- componentes de dispositivos extracorpóreos que removem e retornam sangue do corpo;
- dispositivos que são inseridos em um vaso sanguíneo;
- dispositivos que ficam permanentemente implantados.

Para dispositivos de aplicações em tecidos moles, os materiais se propõe a aumentar ou redefinir o tecido (ex.: implantes de seios e implantes faciais). Em aplicações ortopédicas e odontológicas, os materiais são componentes de implantes estruturais (ex.: próteses de juntas e implantes de raiz de dentes) ou são usados para reparar defeitos ósseos (ex.: parafusos e pinos inseridos em osso).

Quanto ao tipo de material, os biomateriais podem ser: polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais (ex.: biopolímeros) que são manufacturados ou processados para se adequarem à utilização em dispositivos médicos que entram em contato íntimo com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos.

Os biomateriais devem ser isentos de produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ou seja: o material deve ser não-tóxico, não-carcinogênico, não-antigênico e não-mutagênico. Em aplicações sanguíneas, eles devem também ser

não-trombogênicos. As complicações oriundas dos dispositivos implantados irão variar de acordo com a sua aplicação. Por exemplo, infecções e biodegradação irão afetar dispositivos que têm aplicações de longa duração como próteses permanentes e válvulas cardíacas.

O termo biocompatibilidade foi redefinido em 1987 por Williams como sendo a habilidade de um material desempenhar com uma resposta tecidual apropriada em uma aplicação específica (WILLIAMS, 1992A).

A Tabela 1 lista os tipos de biomateriais usados em diferentes aplicações: sintéticos, bioreabsorvíveis, derivados de materiais biológicos, bioderivados de macromoléculas, modificações de superfícies por passivação, recobrimentos bioativos, adesivos de tecidos, metais e ligas metálicas, cerâmicas/inorgânicos/vidros, carbonos e compósitos.

Tabela 1 Biomateriais e Suas Aplicações (HELMUS e TWEDEN, 1995).

MATERIAL	APLICAÇÕES
Sintéticos Não degradáveis	
Acrílicos	Suportes para dispositivos extra-corpóreos
Epoxies	Suportes, compósitos de fibras
Fluorcarbonetos	Enxertos vasculares, camadas em catéter, remendos periodontais, remendos abdominais
Hidrogeis	Camadas para catéter, antiadesivos
Poli acetatos	Estruturas para válvula cardíaca, partes estruturais
Poli amidas	Suturas
Poli amida elastomérica	Catéter, curativos para ferimentos
Poli carbonatos	Suportes para dispositivos extra-corpóreos
Poli ésteres	Enxertos vasculares, balões para angioplastia
Poli ésters elastoméricos	Catéters
Poli eteracetonas	Componentes estruturais, dispositivos ortopédicos
Poli imidas	Componentes estruturais, catéters
Poli (metacrilato de metila)	Cimento ósseo, lentes intra-oculares
Poli metil-penteno	Suportes para dispositivos extra-corpóreos
Poli olefinas	Suturas, balões para angioplastia, catéters
Poli olefina elastoméricas	Tubos, corações artificiais, catéters
Filmes de poli olefina de alta cristalinidade	Balões para angioplastia
Poli sulfonas	Componentes de sutura, dispositivos ortopédicos
Poliuretanos	Catéters, corações artificiais, curativos
Poli cloreto de vinila	Tubos, bolsas sangüíneas
Silicones	Juntas para dedos, catéters, válvulas cardíacas, curativos
Polietileno de ultra alto peso molecular	Cálice acetibular, tecidos de alta resistência
Bioreabsorvíveis	
Poli aminoácidos	Peptídeos de adesão celular e liberação controlada
- 4 -Poli anidridos	Liberação controlada
Poli caprolactonas	Suturas, liberação controlada
Copolímeros de poli ácido láctico/ácido glicólico	Suturas, liberação controlada, placas ósseas
Poli hidroxil butiratos	Liberação controlada, placas ósseas
Poli ortoésteres	Liberação controlada
Colágeno	Camadas, reconstrução de tecidos moles
Hidroxiapatita de baixa densidade	Implantes ósseos, cirurgia reconstrutiva

MATERIAL	APLICAÇÕES
Materiais biologicamente derivados	
Artérias e veias bovinas	Enxertos vasculares
Pericárdio bovino	Substitutos de pericárdio, válvulas cardíacas
Ligamentos bovinos	Ligamentos
Tendões bovinos	Tendões
Osso bovino liofilizada	Implantes ósseos
Osso bovino descalcificado	Implantes ósseos
Cordão umbilical humano	Enxertos vasculares
Válvula cardíaca porcina	Válvulas cardíacas
Macromoléculas bioderivadas	
Albumina liofilizada	Camadas de enxerto vascular, agente de contraste ultrassônico
Acetatos de celulose	Membranas para hemodiálise
Celulose de cupramônia	Membranas para hemodiálise
Quitosana	Experimental, camadas, liberação controlada
Colágeno	Camadas, curativos, órgãos híbridos
Elastina	Camadas
Gelatina liofilizada	Camadas para corações artificiais
Ácido hialurônico	Camadas, antiadesivo, anti-inflamatório ocular e de junta
Fosfolípidios	Lipossomos, camadas experimentais tromboresistentes
Seda	Suturas, camadas experimentais de proteínas do tipo seda
Recobrimentos passivos	
Albumina	Tromboresistência
Cadeias de alcanos	Adsorve albumina para tromboresistência
Fluorcarbonos	Arraste reduzido para catéters
Hidrogels	Arraste reduzido para catéters
Silicones livres de sílica	Tromboresistência
Óleos de silicone	Lubrificante para agulhas e catéters
Recobrimentos Bioativos	
Hidroxiapatita	Recobrimentos em implantes edósseos
Angicoagulantes (ex.: heparina e hirudina)	Tromboresistência
Antimicrobianas	Resistência à infecção
Peptídeos aderentes a células	Adesão celular melhorada
Proteínas aderentes a células	Adesão celular melhorada
Superfícies carregadas negativamente	Tromboresistência
Camadas polimerizadas por plasma	Adesão celular melhorada
Trombolíticos	Tromboresistência
Tecidos adesivos	
Cianoacrilatos	Microcirurgia para anastomose de vasos
Cola de fibrina	Camada de enxerto vascular, microcirurgia
Cola de molusco	Adesão celular melhorada
Metais e Ligas Metálicas	
Ligas cobalto-cromo, ligas níquel-cromo, ligas nitinol, (ligas efeito memória de forma), aços inoxidáveis, tântalo, titânio e suas ligas	Arames guias, válvulas de coração mecânico, orifícios e braços, válvula de coração biológico implantes ortopédicos e odontológicos, placas para fraturas, pregos e parafusos para reparo ósseo, coberturas para veia cava, suportes para corações artificiais, comandos para marca-passos e para estimuladores elétricos implantáveis
Cerâmicas, inorgânicos e vidros	
Vidros bioativos	Ligação óssea, cirurgia reconstrutiva
Vitro-cerâmicas bioativas	Ligação óssea, cirurgia reconstrutiva
Alumina de alta densidade	Implantes odontológicos e ortopédicos
Hidroxiapatita	Ligação óssea, cirurgia reconstrutiva
Alumina monocristalina	Implantes ortopédicos e odontológicos
Fosfatos tricálcios	Reparo ósseo
Zircônia	Implantes ortopédicos e odontológicos
Carbonos	
Carbono pirolítico (isotrópico de baixa temperatura)	Válvulas cardíacas, camadas cardiovasculares

MATERIAL	APLICAÇÕES
Carbono isotrópico de ultra-baixa temperatura	Camadas em polímeros sensíveis à temperatura
Compósitos	
Compósitos de fibra de carbono baseados em uma matriz de epoxi, poli éteracetonas, poli imida, poli sulfona	Materiais potenciais para orifícios, discos e implantes ortopédicos
Radiopacificadores (BaSO ₄ ; BaCl ₂ ;TiO ₂) misturados em polímeros de poli olefinas, poliuretanos, silicones	Radiopaco em raios-X para identificação e localização do dispositivo
Radiopacificadores em polimetimetacrilato	Cimento ósseo radiopaco

A seleção do material a ser utilizado deve levar em consideração as propriedades físicas, químicas e mecânicas do material. As principais propriedades que devem ser levadas em conta são:

- Resistência: aplicações que requerem alta resistência incluem enxertos de veia aorta, válvulas cardíacas, balões de angioplastia e implantes odontológicos e ortopédicos. Alguns desses dispositivos requerem propriedades bastante específicas;
- Módulo (elasticidade, torsão ou flexão: o módulo de torsão e de flexão é de interesse para materiais como catéteres, que podem sofrer torque e fazer percursos tortuosos dentro dos vasos. Muitos elastômeros devem ter capacidade de se alongar com baixa carga, logo, devem ter baixo módulo de torsão, flexão ou elasticidade.
- Fadiga: os dispositivos que devem suportar esforços cíclicos sem permitir propagação de trinca são em sua maioria feitos de poliuretano, poliéster e metais em geral. Esses dispositivos funcionam em sua maioria como implantes ortopédicos, odontológicos e cardiovasculares.
- Rugosidade: em aplicações onde é desejado baixo atrito, como em implantes de juntas ortopédicas, utilizam-se materiais com acabamentos espelhados. Quando se deseja uma integração tecido-implante, como em implantes endoósseos, é desejada uma alta rugosidade.
- Taxa de permeação: dispositivos como lentes de contato requerem uma alta taxa de permeação de gases. Geralmente a permeação decresce com a cristalinidade do material. Os hidrogéis são permeáveis a água e são muito utilizados como liberadores de drogas.

- Absorção de água: alguns materiais sofrem mudanças dramáticas em sua resistência a tração, à fadiga, à fluência, em seu módulo de elasticidade, torsão ou flexão quando ligeiramente umedecidos. A degradação também é afetada pela absorção de água: materiais hidrofílicos tendem a se degradar do interior para a superfície enquanto materiais hidrofóbicos tendem a ter primeiramente suas superfícies degradadas.
- Bioestabilidade: dispositivos como fios de sutura e liberadores de drogas devem ter sua degradação controlada, enquanto implantes permanentes devem ser estáveis.
- Bioatividade: a bioatividade se refere à propriedade inerente a alguns materiais de participarem em reações biológicas específicas. Camadas bioativas podem ser formadas a partir de moléculas que previnem coágulo sangüíneo ou iniciam a degradação enzimática de um trombo. Algumas superfícies negativamente carregadas iniciam a degradação de componentes complementares com o potencial para menores efeitos colaterais para tratamentos como diálise. A hidroxiapatita é muito utilizada como recobrimento para implantes endoósseos. Essa camada constitui uma superfície bioativa para o ancoramento de osso neoformado.
- Esterilização: o método de esterilização utilizado pode alterar o estado energético da superfície de um implante, alterando a resposta celular. Os polímeros podem ter suas propriedades negativamente alteradas quando esterilizados por irradiação com raios gama.

II.4.1 HISTÓRICO DA OSTEINTEGRAÇÃO

O termo “osteointegração” foi definido pelo Professor Per-Ingvar Brånemark como sendo a ligação direta, estrutural e funcional entre osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeito a cargas funcionais. A osteointegração foi observada enquanto o Prof. Brånemark estava realizando estudos clínicos *in situ* e *in vivo* de osso medular em fíbula de coelhos. Esses estudos foram realizados com uma técnica de microscopia vital que consistia em uma leve inserção de uma câmara de titânio contendo um sistema ótico na fíbula do coelho. As câmaras óticas não podiam ser retiradas do osso ao redor após um período de tempo já que a retirada resultava em osso aderido às câmaras (BRANEMARK, 1985).

Em estudos usando microscopia eletrônica de varredura, observou-se a existência de uma camada de lipoproteínas entre o implante e o tecido ósseo. O conceito de osteointegração foi então redefinido com ênfase no implante estar em função, já que a observação do contato direto osso-implante depende da escala de aumentos que estiver sendo utilizada. A definição aceita atualmente é a de Zarb e Albrektsson “Osteointegração é o processo pelo qual a fixação rígida e assintomática de um material aloplástico no osso é obtida e mantida durante a função” (HOBKIRK e WATSON, 1996).

A aplicação mais óbvia da osteointegração é em implantes endoósseos. No caso de pacientes edêntulos, pode-se argumentar que uma prótese preencheria o papel do implante. No entanto, a perda contínua de osso alveolar resultante de estímulo de carregamento para remodelamento inadequado geralmente causa a instabilidade da prótese, gerando problemas funcionais e psicológicos ao paciente.

Inicialmente, tentou-se interpor uma camada amortecedora entre o implante e o tecido ósseo, simulando o ligamento periodontal. Após 30 anos de trabalho experimental e 20 anos de resultados clínicos, Branemark e sua equipe desenvolveram um implante rosqueado que é inserido na mandíbula ou maxila e conectado à prótese através de um abutment e um parafuso central, como mostrado na Figura 1.

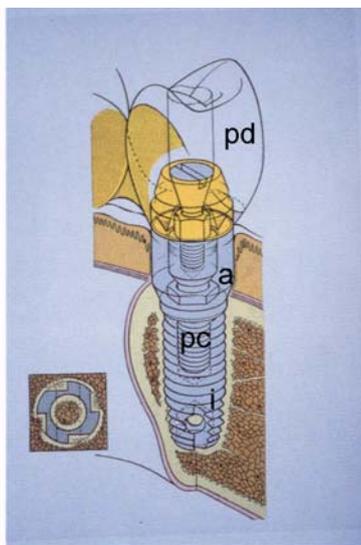


Figura 1 Representação esquemática da unidade de ancoragem de Branemark, composta de: implante rosqueado (i); abutment (a); parafuso central (pc) e prótese dentária (pd) (BRANEMARK, 1985).

A técnica cirúrgica foi empiricamente definida como sendo feita em duas etapas: na primeira, o implante é inserido e deixado até que o osso se regenere e remodele durante um período que varia de três a seis meses, sem carregamento; na segunda etapa, a prótese é inserida através da conexão do abutment e do parafuso central ao implante. Durante a fase de regeneração, é formado osso novo próximo ao implante, que está imóvel. Quando o implante entra em função, o osso neo-formado se remodela segundo a magnitude, direção e frequência do esforço aplicado. Após cerca de 18 meses, um estado estacionário é alcançado, o que significa que foi alcançado um equilíbrio entre as forças atuantes sobre o implante e as capacidades de remodelamento do osso ancorado. As etapas de regeneração e remodelamento podem ser vistas na Figura 2 onde a área hachurada no topo ilustra a redução em altura de osso ancorado, expressa em porcentagem do nível original de osso mandibular embutido, que ocorre durante as fases de regeneração e remodelamento (BRANEMARK, 1985).

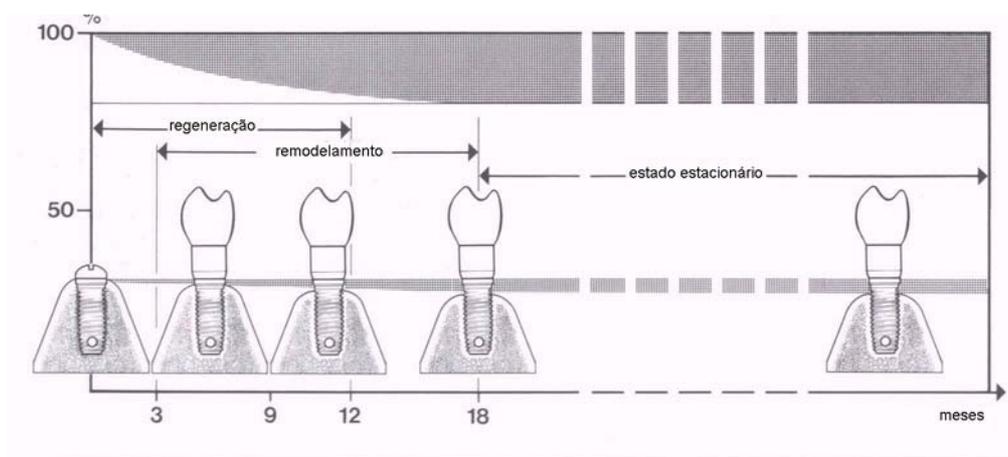


Figura 2 Relação dinâmica entre implante e osso mandibular (BRANEMARK, 1985).

O sucesso da osteointegração depende de seis fatores (BRANEMARK, 1985):

i. Biocompatibilidade do implante;

Titânio comercialmente puro, o nióbio e o tântalo são conhecidos por serem bioreativos. As ligas Co-Cr-Mo e os aços inoxidáveis têm demonstrado menor aceitabilidade no leito ósseo. De um modo geral, as ligas metálicas são menos aceitas devido à possibilidade de liberação de íons, que podem causar efeitos colaterais locais ou sistêmicos.

ii. Características do desenho;

Existe atualmente extensa documentação sobre implantes rosqueados, que demonstraram funcionar durante décadas sem problemas clínicos. Os outros projetos de implantes como implantes cilíndricos lisos, em formato de cunha ou raiz dentária, cônicos e outros requerem mais informações clínicas.

iii. Características de superfície;

De um modo geral, as superfícies rugosas são preferidas. No entanto, existe um nível ótimo de rugosidade ainda não muito bem estabelecido. Superfícies completamente lisas não resultam em boa adesão celular e acabam sendo ancoradas em tecido mole, seja qual for o material utilizado. Superfícies com rugosidade em uma escala que permita a vascularização são desejadas. Outros parâmetros de superfície que estão sendo investigados são: estado energético, molhabilidade, pureza, dentre outros.

iv. Estado do leito hospedeiro;

É necessária presença de leito receptor saudável e com quantidade óssea suficiente. No entanto, pode ser que esses requisitos não sejam satisfeitos. Nesse caso, alternativas são adotadas a fim de se criar as condições favoráveis. Uma das técnicas mais utilizadas é a regeneração tecidual guiada, que é uma técnica de enxerto autógeno que reconstitui a perda óssea ocorrida.

v. Técnica cirúrgica;

A técnica cirúrgica deve impor o menor trauma e o menor sobreaquecimento possíveis. Para tanto, utiliza-se baixa velocidade de rotação da broca e refrigeração abundante. O sobreaquecimento pode causar denaturação de uma das enzimas ósseas, a fosfatase alcalina, além da destruição das células que participariam na reparação óssea. O torque muito elevado no momento da inserção do implante também pode causar tensão no osso e uma resposta de reabsorção óssea.

vi. Condições de aplicação das cargas.

De acordo com a técnica estabelecida por Branemark, utiliza-se uma espera de 3 meses para a aplicação de cargas a implantes inseridos em mandíbula e de 4 a 6 meses para aqueles inseridos em maxila.

CLASSIFICAÇÃO DOS BIOMATERIAIS QUANTO À RESPOSTA BIOLÓGICA

Existem várias classificações para os materiais quanto à resposta biológicas. Quando se consideram os materiais de maneira genérica (não se restringindo aos biomateriais), os materiais podem ser classificados em tóxicos e não tóxicos. Quando se considerando apenas os biomateriais, estes podem ser classificados em materiais bioinertes, bioreativos e bioativos.

DESCOUTS *et al.* (1995) incluem ainda a categoria de materiais bioartificiais. Esses materiais podem ser definidos como sendo uma combinação de materiais sintéticos e células vivas.

A Figura 3 divide os materiais em três zonas: na zona vermelha ficam os materiais tóxicos, na zona amarela, os bioinertes e na zona verde, os materiais que interagem positivamente com o corpo humano.

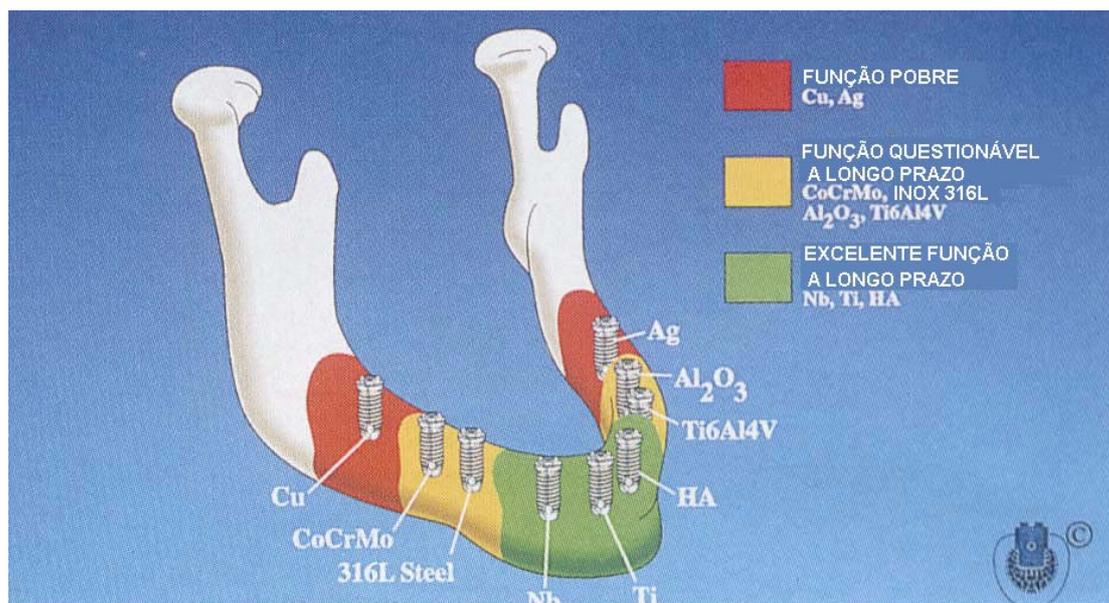


Figura 3 Biocompatibilidade de implantes odontológicos (HOBKIRK E WATSON, 1996).

Os materiais aos quais o tecido ósseo tem demonstrado maior tolerância estão na zona verde e são exemplificados pelo titânio, nióbio, tântalo e hidroxiapatita (HA). Outros materiais como os aços inoxidáveis, ligas Cr-Co-Mo, óxidos de alumínio e zircônio, ligas de titânio, dentre outros, são questionáveis quanto a função a longo

prazo. Os materiais posicionados na zona vermelha são aqueles que apresentam resposta adversa do tecido ósseo.

A MATERIAIS BIOINERTES

São materiais menos suscetíveis a causar uma reação biológica adversa devido a sua estabilidade química em comparação com outros materiais. Como exemplos, pode-se citar: carbono, alumina e zircônia (DUCHEYNE E KOHN, 1992). A alumina e a zircônia são mais usadas em superfícies de juntas artificiais sujeitas à fricção por causa da sua boa resistência ao desgaste.

As cerâmicas são quimicamente muito estáveis e, portanto, muito pouco prováveis de ter uma resposta biológica adversa. As cerâmicas bioinertes mais empregadas como biomateriais são: cerâmicas à base de carbono, alumina e zircônia.

A1 CERÂMICAS À BASE DE CARBONO

O carbono possui similaridades com o osso em relação à rigidez e à resistência. O grafite possui um arranjo hexagonal planar com alta energia de ligação entre átomos no mesmo plano e baixa energia de ligação entre os planos. Essa baixa ligação entre os planos confere um baixo módulo, próximo àquele do osso.

Há três tipos isotrópicos de carbono: pirolítico, vítreo e depositado por vapor. O carbono pirolítico é obtido através da deposição de carbono, a partir de um leito fluidizado, em um substrato. O leito fluidizado é formado a partir da pirólise de gás hidrocarbônico em temperaturas na faixa de 1000-2500°C. Carbonos isotrópicos de baixa temperatura são formados em temperaturas abaixo de 1500°C. O carbono isotrópico de baixa temperatura possui boas resistências à fricção e ao desgaste. Tem sido feitas várias tentativas de recobrimento de metais com carbonos isotrópicos de baixa temperatura. O fator limitante é a propensão à fratura da camada e a decoesão da mesma do substrato. O carbono depositado por vapor é evaporado sobre um substrato a partir de uma fonte de alta temperatura, obtendo-se camadas de até 1µm de espessura (DAUSKARDT, 1993).

A2 ALUMINA

As aluminas policristalinas de alta densidade e alta pureza são utilizadas em cabeça de fêmur e componentes acetabulares. Além da estabilidade química e inércia

biológica, uma importante característica é a resistência à fricção e ao desgaste. Geralmente a cabeça do fêmur é confeccionada em alumina e a articulação em polietileno ou alumina. A Figura 4 mostra uma prótese de fêmur.



Figura 4 Prótese de fêmur de titânio com cabeça de alumina.

As propriedades físicas e mecânicas da alumina densa são uma função da pureza, tamanho e distribuição dos grãos, das porosidades e das inclusões. A maior limitação da alumina é que ela possui baixa tenacidade, baixa resistência à tração e à flexão. Há ainda uma limitação dimensional quanto ao raio ótimo. Raios de curvatura muito grandes criam uma superfície de contato muito grande, aumentando muito a pressão de contato. Raios muito pequenos não permitem o escape de partículas de alumina.

A3 ZIRCÔNIA

A zircônia surgiu como alternativa à alumina por possuir maior tenacidade. A zircônia tem estrutura monoclinica à temperatura ambiente e sofre uma transformação isotrópica para estrutura tetragonal. Adições de óxido de ítrio (Y_2O_3) servem para estabilizar a fase tetragonal à temperatura ambiente. A propagação de trincas induz a transformação da fase tetragonal, que é metaestável, na fase monoclinica. Como os grãos monoclinicos são maiores, é gerado um campo de tensão compressivo na ponta da trinca. Esse efeito causa uma imobilização da trinca. As melhores propriedades mecânicas em relação à alumina permitem uma maior liberdade dimensional na confecção dos implantes (HULBERT, 1993).

B MATERIAIS BIOREATIVOS

Materiais bioreativos: os metais utilizados em ortopedia e em implantodontia dominam essa classe de materiais. No entanto, a maioria dos biomateriais metálicos não é bioreativa, ficando mais próxima à classe dos materiais bioinertes. A biocompatibilidade dos metais e ligas é baseada na formação de uma camada fina e

aderente de óxido estável. Cada classe de metal deve ter sua composição química bem controlada a fim de que não haja degradação química da camada de óxido nem das propriedades mecânicas do metal ou liga metálica. Os principais metais utilizados como biomateriais são divididos em três classes: ligas ferrosas (aços inoxidáveis), ligas à base de cobalto e ligas à base de titânio. Os metais classificados como bioreativos ficam no limite entre os materiais bioinertes e os bioativos. Esses metais adquirem bioatividade após um tratamento de ativação de superfície do seu óxido. São eles o titânio, o nióbio e o tântalo.

B1 AÇOS INOXIDÁVEIS

O aço inoxidável mais utilizado é o aço inox 316L, que é um aço austenítico endurecível por encruamento. Esse tipo de aço inox tem baixo teor de carbono (0,03% máx.), o que confere maior resistência à corrosão em meios salinos e ricos em cloreto. O níquel em sua composição é responsável pela estabilização da austenita e resistência à corrosão. Sua inoxidabilidade é dada pelo teor de cromo. Teores deste elemento acima de 28% possibilitam a precipitação de Cr_{23}C_6 nos contornos de grão, que seriam sítios preferenciais para corrosão intergranular. O sobreaquecimento durante o processo de soldagem de componentes também pode produzir corrosão intergranular.

As principais limitações da utilização de implantes de aço inox são corrosão e troca iônica. Os aços inoxidáveis sofrem corrosão *in vivo* e liberam íons do tipo Ni^{2+} , Cr^{3+} e Cr^{6+} , que podem causar efeitos locais (irritação, inflamação nas áreas adjacentes à interface implante-tecido) e sistêmicos (efeito tóxico sobre o organismo).

B2 LIGAS À BASE DE COBALTO

As ligas de cobalto mais utilizadas como implantes ortopédicos são: a liga fundida Co-Cr-Mo (ASTM F75, 1982) e a liga forjada Co-Cr-W-Ni (ASTM F90, 1982). O alto limite de resistência e a alta resistência em fadiga fazem dessas ligas uma boa alternativa para utilização em reconstrução de juntas.

B3 TITÂNIO E LIGAS À BASE DE TITÂNIO

O titânio possui uma combinação de alta resistência mecânica, alta resistência à corrosão eletroquímica e resposta biológica favorável, que fazem com que ele seja o metal mais utilizado como biomaterial. Dentre as ligas de titânio, a liga Ti-6Al-4V (ASTM F136, 1984) é a mais utilizada em várias aplicações, incluindo aplicações biomédicas.

O titânio é um metal especial dentre os metais leves como alumínio e magnésio por sua elevada razão resistência/peso. O titânio é também um metal bastante reativo e em contato com ppm (parte por milhão) de O₂ ou água, forma óxido de titânio que pode ser TiO, Ti₂O₃ ou TiO₂, que é o mais comum. O TiO₂ pode apresentar diferentes estruturas cristalográficas, dentre elas, rutilo e anatásio, podendo também ser amorfo. Uma contribuição para a biocompatibilidade do titânio é a grande resistência à corrosão que é conferida por seu óxido, que forma uma película contínua e aderente. Uma outra contribuição é a sua alta constante dielétrica quando comparada com a de outros óxidos. KASEMO E LAUSMAA (1985) atribuem a alta constante dielétrica do TiO₂ à biocompatibilidade do titânio, já que as interações entre os óxidos e as biomoléculas são elétricas e o TiO₂ é catalítico para um número de reações orgânicas e inorgânicas.

O TiO₂ promove forças de Van der Waals maiores do que as dos outros óxidos, logo apresentando propriedades catalíticas em diversas reações químicas. WILLMANN (1999) classifica o titânio como bioinerte. Por outro lado, vários autores (KOKUBO *et al.*, 1996; SOARES *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1996; YAN *et al.*, 1996) têm demonstrado o efeito das modificações de superfície sobre a bioatividade do titânio. Nesses substratos, a precipitação de fosfatos de cálcio ocorre por adsorção de íons fosfato hidratados, liberação de prótons dos íons fosfato e adsorção de cálcio pelo fosfato. O TiO₂ não pode se recompor em meio anidro, causando a corrosão do metal. A natureza, bem como a composição e espessura da camada do óxido depende das condições do meio circunvizinho. Geralmente, em meio aquoso, o óxido presente é o TiO₂. No entanto, pode haver uma mistura de óxidos outros como Ti₂O₃ e TiO. Observações experimentais da interface tecido ósseo-Ti mostra um contato íntimo osso-implante.

O titânio comercialmente puro não é tão resistente à fadiga quanto certos aços e ligas de titânio. O titânio tem um módulo de elasticidade intermediário entre o do aço e o do osso. Sua resistência ao impacto é comparável aos aços baixo carbono temperados e revenidos (METALS HANDBOOK, 1990A). A seleção do parâmetro de propriedades mecânicas mais relevante depende da temperatura de trabalho.

A Tabela 2 mostra comparativamente as propriedades mecânicas do titânio comercialmente puro, da liga de titânio Ti-6Al-4V e do osso cortical. Observa-se que o módulo de elasticidade do titânio é em torno de 5 vezes o do osso cortical.

Tabela 2 Propriedades mecânicas de titânio comercialmente puro, Ti-6Al-4V e osso cortical (METALS HANDBOOK, 1990A; METALS HANDBOOK, 1990B).

MATERIAL	PROPRIEDADES MECÂNICAS	
	σ_s (Mpa)	E (Gpa)
TITÂNIO GRAU 4	550	110
Ti6Al4V RECOZIDA	895	124
OSSO CORTICAL	70	20

A primeira aplicação industrial do titânio foi no início dos anos 50, na indústria aeroespacial. Para essa aplicação, a alta resistência mecânica e baixa densidade (55% da densidade do aço) foi um fator atraente. Embora a indústria aeronáutica ainda continue a utilizar titânio e suas ligas, a excelente resistência à corrosão em diversos meios incluindo os meios oxidantes ricos em cloretos tem levado à aplicação em outras áreas como na medicina e odontologia, em próteses e implantes endoósseos osteointegrados. A resistência à corrosão característica do titânio é baseada na formação superficial de um filme de óxido aderente e estável que protege o interior do material do meio circunvizinho (METALS HANDBOOK, 1990A).

As aplicações do titânio e suas ligas na área biomédica incluem desde bombas e dispositivos de corações artificiais a aplicações mais estruturais como parafusos e pinos em implantes odontológicos e próteses ósseas para braços, pernas e juntas (METALS HANDBOOK, 1990A). Diversos autores (DE REZENDE *et al.*, 1993; MOHAMEDI *et al.*, 1995; ROBERTS *et al.*, 1986; ORON, 1995) têm demonstrado a superioridade do titânio como biomaterial sobre outros metais.

Muitos esforços têm sido concentrados no aprimoramento da osteointegração. Nesse sentido, os implantes com superfícies porosas especialmente preparadas têm sido utilizados para promover o crescimento ósseo em direção aos póros do implante. Dessa forma, obtém-se uma aposição óssea mais forte e mais duradoura. Aplicações recentes incluem a utilização da liga Ti-15Mo-5Zr-3Al como fio para suturas e fixação de implantes, bem como a exploração do efeito memória-de-forma em ligas Ni-Ti para criar tensões compressivas a fim de forçar a reconstituição de ossos fraturados ou alargar vasos sanguíneos (METALS HANDBOOK, 1990B).

Apesar do caráter inerte, casos de dissolução da camada de óxido têm sido reportados. Estudos recentes estão concentrados no desenvolvimento de

propriedades de superfície anteriormente à inserção no corpo humano. Como consequência, várias técnicas de recobrimento têm sido desenvolvidas. Técnicas de recobrimento com materiais bioativos como a hidroxiapatita, que é um fosfato de cálcio têm sido exaustivamente estudadas. As propriedades físicas do recobrimento como tamanho, morfologia, fases presentes, cristalinidade e espessura da camada devem ser avaliadas. Alterações introduzidas na camada durante o processo de recobrimento podem afetar o desempenho do implante.

B4 NIÓBIO

O nióbio, como o tântalo e o titânio, é um metal bioreativo. Estudos recentes, (OGASAWARA *et al.* 1999A; OGASAWARA *et al.* 1999B) têm demonstrado o potencial desse metal em aplicações biomédicas. Esse potencial pode ser explorado tanto para aplicações como substituto ao vanádio na liga Ti6Al4V quanto na utilização de nióbio puro. Estudos complementares ainda são necessários para que se caracterize esse metal *in vitro* e *in vivo*.

C MATERIAIS BIOATIVOS

O termo bioatividade é definido como sendo a propriedade de formar tecido sobre a superfície de um biomaterial e estabelecer uma interface capaz de suportar cargas funcionais (DUCHEYNE E KOHN, 1992). O conceito de bioatividade foi introduzido com respeito aos biovidros através da seguinte hipótese: “A biocompatibilidade de um material para implante é ótima se o material proporciona a formação de tecidos normais na sua superfície e, adicionalmente, se ele estabelece uma interface contínua capaz de suportar as cargas que normalmente ocorrem no local da implantação” (KOHN E DUCHEYNE, 1992). Três classes de materiais cerâmicos parecem cumprir esse papel: vidros bioativos e vitro-cerâmicas, cerâmicas de fosfato de cálcio e compósitos desses vidros e cerâmicas com fases inertes.

C1 VIDROS BIOATIVOS (BIOGLASS) E VITRO-CERÂMICAS

Os vidros bioativos foram desenvolvidos pelo Prof. Larry L. Hench, que sintetizou vários vidros contendo misturas de sílica, fosfato, óxido de cálcio e soda. Esses materiais foram desenvolvidos para utilização como implantes e como recobrimento.

Quando imersa em um meio aquoso, a superfície dos biovidros libera íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Essas espécies são repostas com íons H_3O^+ da solução através de uma reação de troca iônica que produz uma camada superficial de sílica-gel. Uma camada de

apatita amorfa se forma no topo da camada de sílica gel. Essa hidroxiapatita amorfa evolui para hidroxiapatita cristalina (KOKUBO, 1993).

C2 FOSFATOS DE CÁLCIO

Os fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos com razões Ca/P variadas. Dentre elas, as cerâmicas de apatita são as mais estudadas. Apatita é o nome de uma vasta série de minerais isomorfos. O nome “apatites”, do grego, enganadora, justifica as dificuldades envolvidas na sua identificação devido à sua falta de estequiometria. As apatitas são formadas sob condições variadas, mas comumente ocorrem como minerais agregados a rochas ígneas. Elas também ocorrem em rochas sedimentares marinhas formadas por deposição química, em fósseis e em rochas metamórficas. Variam amplamente em tonalidade, desde o transparente, passando pelo amarelo, verde, marrom, vermelho e azul. Algumas apatitas exibem um fluorescência amarela sob luz ultravioleta. Os cristais são hexagonais, prismáticos e podem se tornar alongados sempre terminando em faces dipiramidais.

As apatitas são definidas pela fórmula química $M_{10}(Y)_6Z_2$ e formam uma gama variada de soluções sólidas como resultado da substituição de sítios M^{2+} , XO_4^{3-} ou Z^- . As espécies M^{2+} são tipicamente cátions metálicos divalentes como Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} ou Cd^{2+} . As espécies Y^{3-} são tipicamente um dos seguintes ânions trivalentes: PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} , CrO_4^{3-} ou MnO_4^{3-} . Os ânions monovalentes Z^- são geralmente F^- , OH^- , Br^- ou Cl^- (KOHN E DUCHEYNE, 1992). O ânion divalente CO_3^{2-} no lugar de Z_2 dá origem às carbonatoapatitas.

Os fosfatos de cálcio de relevância biológica são: fosfato de cálcio amorfo, brushita, monetita, fosfato de cálcio octacálcio, fosfato de cálcio tricálcio, pirofosfato de cálcio e apatita. Dentre as fases minerais presentes em calcificações normais, ou seja, não patológicas, as apatitas são as mais comumente encontradas. Estudos de difração de Raios-X e análise química em 1926 identificaram a fase mineral da dentina, esmalte e osso como sendo fosfato de cálcio com uma estrutura de apatita, idealizada como $(Ca)_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, ou seja: hidroxiapatita. No entanto, tem sido discutida a não estequiometria bem como a presença de elementos substitutivos na fase mineral do esmalte, dentina e osso.

Os membros do grupo das apatitas são diferenciados com base nos seus ânions predominantes, isto é: fluorapatita (F), hidroxiapatita (OH) ou cloroapatita (Cl), dentre outros. A hidroxiapatita pura é um sal duplo de fosfato tricálcio e hidróxido de cálcio e

tem estequiometria $\text{Ca}_2\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ou $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Cada membro pode fazer uma série de substituições isomórficas catiônicas ou aniônicas, levando à formação dos correspondentes isomorfos ou soluções sólidas. Estas substituições podem ser isoiônicas ou heteroiônicas (LEGEROS e LEGEROS, 1993). A Tabela 3 mostra a fórmula molecular e os parâmetros de rede dos principais membros da família das apatitas.

Hidroxiapatita (HA), especificamente hidroxiapatita de cálcio, é um composto de composição, estequiometria - $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ - e cristalografia definidas. A hidroxiapatita de cálcio pertence ao sistema hexagonal, com grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$, que é caracterizado por uma simetria perpendicular a três eixos "a" equivalentes (a_1 , a_2 , a_3), formando ângulos de 120° entre si. A sua célula unitária contém uma representação completa do cristal de apatita, consistindo em grupos de Ca, PO_4 e OH empacotados juntos em um arranjo como visto na Figura 5.

Os arranjos atômicos da fluorapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ e da cloroapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$, onde o fluoreto (F) e o cloreto (Cl), respectivamente, substituem o grupo (OH) na estrutura da apatita são similares. As substituições na estrutura das apatitas nos grupos (Ca), (PO_4) ou (OH) resultam em alterações nos parâmetros de rede e em algumas propriedades como solubilidade e morfologia, sem mudança significativa na simetria hexagonal. A maior estabilidade da fluorapatita é relacionada a uma dificuldade de difusão mássica através do canal formado pelos íons Z^- . Esta estabilidade é refletida na observação da menor solubilidade destas apatitas em relação às apatitas sintéticas sem flúor e também em relação às apatitas biológicas. No caso das cloroapatitas, ocorre perda da simetria hexagonal, exibindo simetria monoclinica (LEGEROS e LEGEROS, 1993).

TABELA 3 Principais membros da família das apatitas (NARASARAJU e PHEBE, 1996).

No.	Nome	Fórmula Molecular	Parâmetros de rede (nm)	
			a	c
1	Hidroxiapatita de Bário	$\text{Ba}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,019	0,770
2	Cloroapatita Cádmiio-Arsênico	$\text{Cd}_{10}(\text{AsO}_4)_6\text{Cl}_2$	1,007	0,726
3	Hidroxiapatita de Cádmiio	$\text{Cd}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	0,901	0,661
4	Cloroapatita de Cádmiio	$\text{Cd}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$	0,962	0,649
5	Hidroxiapatita de Cálcio	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	0,942	0,688
6	Carbonato Apatita ^a	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$	0,956	0,687

7	Cloroapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$	0,963	0,678
8	Fermorita	$\text{Ca}_{10}(\text{AsO}_4)_6\text{F}_2$	0,975	0,692
9	Fluoroapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	0,935	0,658
10	Hidroxiapatita	$\text{Ba}_{10}(\text{VO}_4)_6(\text{OH})_2$	0,982	0,698
11	Hidroxiapatita de Chumbo	$\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	0,990	0,729
12	Magnésio Apatita	$\text{Mg}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	0,930	0,689
13	Mimetita ^b	$\text{Pb}_{10}(\text{AsO}_4)_6\text{Cl}_2$	1,036	0,752
14	Piromorfita ^b	$\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$	0,995	0,732
15	Hidroxiapatita de Estrôncio	$\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	0,976	0,728
16	Vanadinita	$\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$	1,047	0,743

^aExiste ambiguidade a respeito da fórmula molecular

^bTambém reportados como membros da série piromorfita

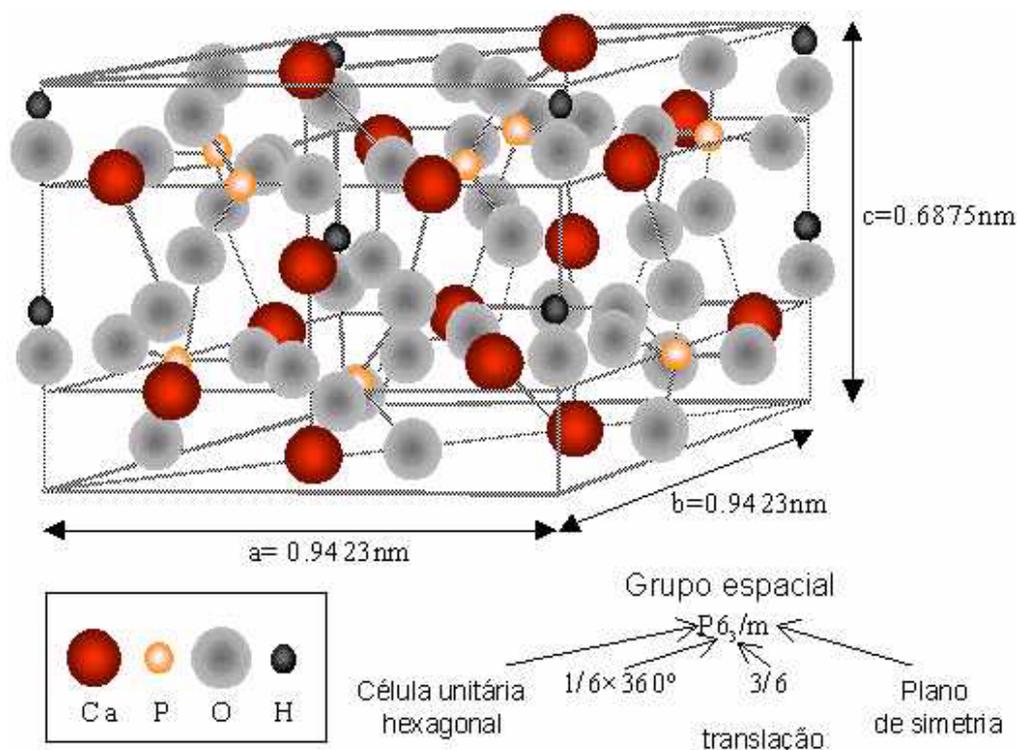


Figura 5 Arranjo atômico da hidroxiapatita (McGREGOR, 1998).

O carbonato, CO_3^{2-} , pode fazer substituições tanto no grupo da hidroxila OH^- quanto no do fosfato PO_4^{3-} , designadas como substituições do tipo A ou B, respectivamente. Estes dois tipos de substituições têm efeitos opostos nos parâmetros de rede (eixos “a” e “c”): A substituição do tipo A causa uma expansão no eixo “a” e uma contração no eixo “c”, ao passo que a substituição do tipo B causa uma contração no eixo “a” e uma expansão no eixo “c”. As substituições do tipo B associadas a substituições de Ca^{2+} por Na^+ causam mudanças morfológicas nos cristais de apatita: de acicular para bastões e para

equiaxiais com aumento do teor de carbonato (LEGEROS E LEGEROS, 1996B). A existência de cavidades na estrutura cristalina responde pela porosidade e consequente atividade superficial das apatitas (BRANEMARK, 1985). Várias substituições que também alteram as propriedades das apatitas ocorrem, além daquelas mencionadas até aqui. São elas: Ca^{2+} por Sr^{2+} e Ca^{2+} por Mg^{2+} , que causam uma maior solubilidade das apatitas; quando presentes simultaneamente, os substituintes podem ter efeitos sinérgicos ou antagônicos nas suas propriedades. O magnésio e o carbonato têm efeitos sinérgicos sobre a cristalinidade e sobre as propriedades de dissolução das apatitas sintéticas; magnésio e fluoreto ou carbonato e fluoreto têm efeitos antagônicos, o efeito do fluoreto sendo o mais dominante (LEGEROS E LEGEROS, 1996B). A parte inorgânica do tecido ósseo consiste em uma fase amorfa e uma fase cristalina, a primeira sendo fosfato tricálcio enquanto que a última é hidroxiapatita. A fase amorfa predomina em ossos novos e é parcialmente transformada em fase cristalina com a idade (BRANEMARK, 1985).

As apatitas biológicas, que compõem as fases minerais dos tecidos calcificados (esmalte, dentina e ossos) e algumas calcificações patológicas (cálculo dentário humano, pedras salivares e urinárias) são geralmente referidas a hidroxiapatitas de cálcio, HA. Porém, diferem da hidroxiapatita pura em estequiometria, composição, cristalinidade e em outras propriedades físicas e mecânicas. As apatitas biológicas são deficientes em cálcio e apresentam substituição pelo carbonato. Estas apatitas apresentam substituições do tipo B associadas a substituições do Ca^{2+} por Na^+ . Esta dupla substituição é necessária para que haja um balanço de cargas. Em algumas espécies de peixe e tubarão, as substituições são do tipo B associada a OH^- por F^- (LEGEROS E LEGEROS, 1996B). A Tabela 4 mostra a ocorrência dos fosfatos de cálcio em sistemas biológicos. As apatitas biológicas do esmalte diferem em cristalinidade e concentração de elementos minoritários (principalmente CO_3^{2-} e Mg^{2+}) daquelas da dentina e das dos ossos. A apatita do esmalte dentário é a que possui as menores solubilidade e concentração de carbonato e magnésio, além de apresentar o maior tamanho de cristais (LEGEROS E LEGEROS, 1996B).

Tabela 4 Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos (LEGEROS, 1991)

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ocorrência
'Apatita'	$(Ca,M)_{10}(PO_4)_6Z_2$	Esmalte, dentina, osso, cálculo dental, rochas, cálculo urinário, calcificações em tecido mole
Octacálcio fosfato, OCP	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	Cálculo dental e urinário
Brushita, fosfato dicálcio di-hidratado, DCPD	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	Cálculo dental, condrocalcinose, crystalluria, ossos decompostos
Whitlockita, fosfato tricálcio, β -TCP	$(Ca, Mg)_9(PO_4)_6$	Cálculo dental e urinário, pedras salivárias, cáries em dentina, cartilagem artrítica, calcificações em tecido mole
Pirofosfato de cálcio di-hidratado	$Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$	Pseudo depósitos de em fluidos sinoviais

Já que as apatitas biológicas não são hidroxiapatitas puras, a estrutura exata destes compostos permanece não identificada, sendo necessária a investigação de apatitas sintéticas para se aproximar das apatitas naturais, mais complexas.

A ligação da hidroxiapatita com o tecido ósseo tem se mostrado satisfatória a longo prazo. No entanto, suas propriedades mecânicas aliadas à alta fadiga dos implantes não permitem que seja usada como forma de ancoragem para implante submetidos a carregamentos. Desta forma, o recobrimento em materiais de alta resistência mecânica tem sido feito através de implantes com meios de transferência de esforços como poros, lacunas, ranhuras ou superfícies rugosas. Alguns autores têm observado trincas na interface metal-cerâmica (KASEMO E LAUSMAA, 1985). A hidroxiapatita pode ser utilizada como material sólido para preenchimento ósseo ou como recobrimento para qualquer tipo de metal.

II.1.2 ESTABILIDADE DOS FOSFATOS DE CÁLCIO

A inserção de um implante no corpo humano causa interações entre a superfície do implante e os líquidos corporais. Na interface, acontecem reações em escala molecular do tipo dissolução de íons do material, desorção, adsorção e desnaturação de proteínas (KLEIN *et al.*, 1993). No caso da superfície em contato com os fluidos

corporais ser um fosfato de cálcio, pode ocorrer reabsorção do mesmo ou transformação em outro fosfato de cálcio mais estável. Os materiais biodegradáveis são utilizados para promover o crescimento de osso. Sua taxa de reabsorção deve ser igual à taxa de crescimento ósseo. Os mecanismos de biodegradação dos fosfatos de cálcio permanecem não estabelecidos completamente. A solubilidade dos fosfatos de cálcio é geralmente medida em soluções tampão. A dissolução *in vitro* depende, dentre outros fatores, do pH, do tipo, da concentração e do grau de saturação da solução tampão, da composição e cristalinidade dos fosfatos de cálcio. A ordem de solubilidade de alguns dos fosfatos de cálcio é a seguinte: **ACP>TTCP> α -TCP> β -TCP>AP>HA** (HELMUS E TWEDEN, 1995). Essa diferença reflete a influência da composição e das propriedades cristalográficas dos fosfatos de cálcio.

Já que as aplicações dos fosfatos de cálcio envolvem contato com água e outros componentes presentes nos líquidos corporais, é importante se conhecer a estabilidade dos mesmos em solução aquosa.

A. FASES EM EQUILÍBRIO EM ALTA TEMPERATURA

As condições onde a sinterização ocorre, envolvem temperaturas entre 1000 e 1500°C. A Figura 6 mostra as fases em equilíbrio à pressão atmosférica, na ausência de água: fosfato tetracálcio (C_4P), alfa-fosfato tricálcio (α - C_3P), monetita (C_2P) e misturas de óxido de cálcio (CaO) e α -fosfato tricálcio. Observa-se que a hidroxiapatita não é estável nessas condições. Se a pressão de vapor for aumentada de 0 para 500mmHg, o diagrama de equilíbrio será o mostrado na Figura 7, onde observam-se uma grande variedade de misturas contendo apatita (Ap) (DE GROOT *et al.*, 1990).

É difícil prever quais fases estarão presentes à temperatura ambiente, já que os diagramas termodinâmicos não levam em consideração a cinética.

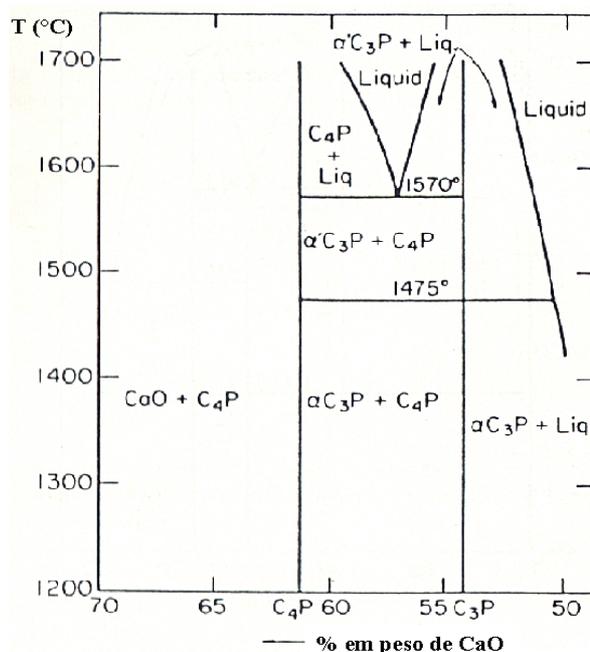


Figura 6 Diagrama de fases do sistema CaO-P₂O₅ em altas temperatura com ausência de água (DE GROOT *et al.*, 1990).

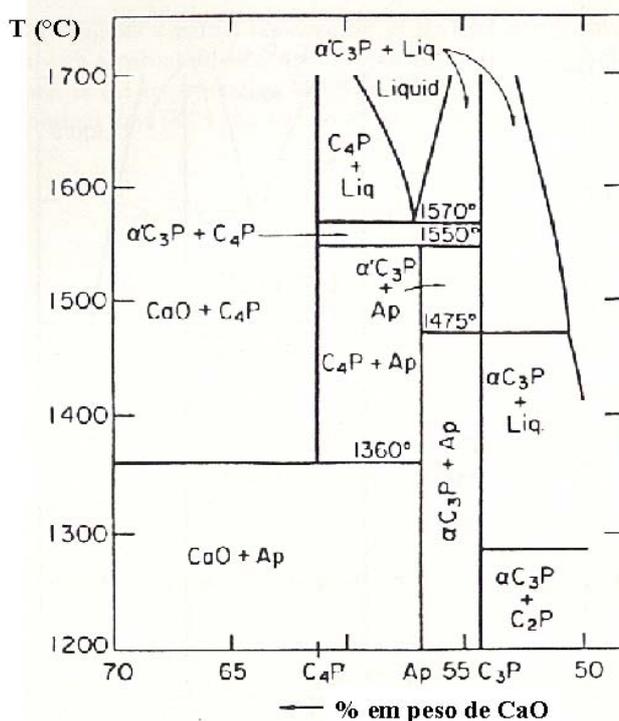


Figura 7 Diagrama de fases do sistema CaO-P₂O₅ em altas temperaturas. pH₂O=500mmHg (DE GROOT *et al.*, 1990).

A estabilidade dos fosfatos de cálcio à temperatura ambiente e em soluções aquosas é determinada pelo pH, como é ilustrado na Figura 8. Observa-se que em pHs

inferiores a 4,8 a fase mais estável (nas condições da Figura 8) é fosfato dicálcio, monetita (CaHPO_4), ao passo que em pHs superiores a 4,8 a fase mais estável é a hidroxiapatita. Fatores como temperatura e potencial aplicado entre eletrodos podem alterar esses valores de pH. As fases termodinamicamente instáveis que são formadas em altas temperaturas mantêm sua composição em temperatura ambiente graças à baixa cinética de reações de estado sólido em baixas temperaturas. Essas fases reagem somente em sua superfície, causando o aparecimento de uma fina camada superficial sobre a fase instável. As fases instáveis mais relevantes são $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (β -fosfato tricálcio) e $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ (fosfato tetracálcio). Essas reações podem ser descritas como (DE GROOT *et al.*, 1990):

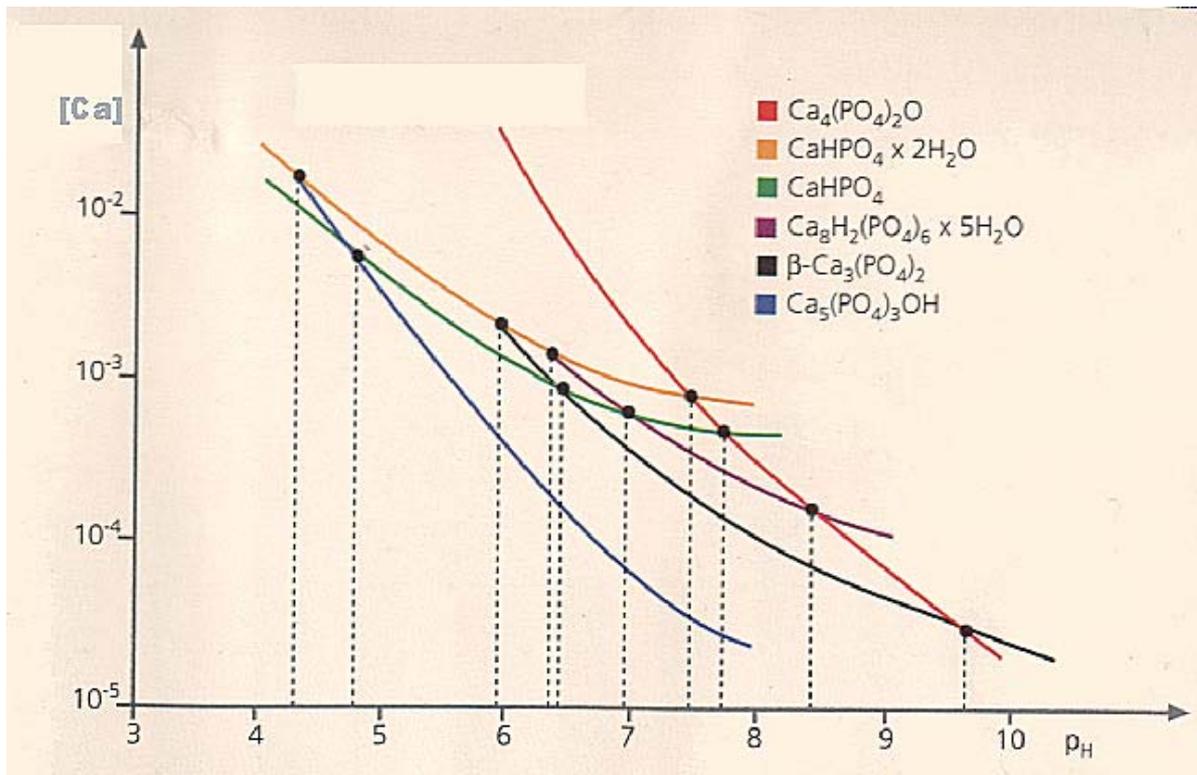
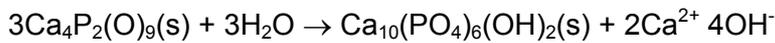
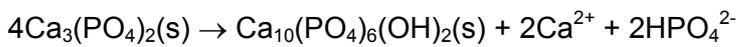
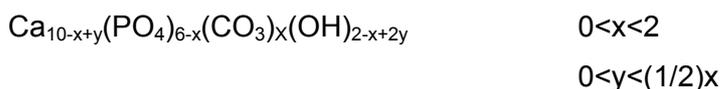


Figura 8 Solubilidade de várias fases no sistema $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$ em função do pH (CERAMTEC, 1997).

Vários íons presentes no meio fisiológico podem ser incorporados à rede da hidroxiapatita, dando origem às carbonato apatitas, fluorapatitas, apatitas com substituições parciais de sódio, apatitas com substituições parciais de potássio, dentre

outras. Essa incorporação pode dar origem a substituição parcial dos íons. Fórmulas genéricas para essas substituições são como (DE GROOT *et al.*, 1990):



Como se pode observar, a substituição parcial pode se dar somente no grupo OH^- ou em ambos os grupos, OH^- e PO_4^{3-} . As incorporações de magnésio acontecem também no fosfato tricálcio, gerando fosfato tricálcio contendo magnésio, sendo essa fase mais estável do que o fosfato tricálcio puro.



BIOVIDROS

Os vidros bioativos foram desenvolvidos pelo Prof. Larry L. Hench, que sintetizou vários vidros contendo misturas de sílica, fosfato, óxido de cálcio e soda. Esses materiais foram desenvolvidos para utilização como implantes e como recobrimento.

Quando imersa em um meio aquoso, a superfície dos biovidros libera íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Essas espécies são repostas com íons H_3O^+ da solução através de uma reação de troca iônica que produz uma camada superficial de sílica-gel. Uma camada de apatita amorfa se forma no topo da camada de sílica gel. Essa hidroxiapatita amorfa evolui para hidroxiapatita cristalina [1].

O material denominado por bioglass[®] corresponde a um biovidro patenteado pelo Prof. Larry Hench, do sistema $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-Na}_2\text{O}$. De acordo com o diagrama mostrado na Figura 9, os vidros com composições relativas à região A são bioativos. Os vidros da região B são inertes e os da região C são bioreabsorvíveis.

Várias outras composições de biovidros foram desenvolvidas posteriormente, algumas patenteadas. Outras, divulgadas em artigos científicos, caíram em domínio público.

BIOVIDROS PARA PREENCHIMENTO DE DEFEITOS ÓSSEOS

Vidros bioativos e cerâmicas podem ser usados sob a forma de grânulos ou corpos porosos em aplicações onde seja necessário o crescimento ósseo ou como recobrimentos bioativos em aplicações como implantes onde uma boa adesão osso-biomaterial é requerida. [2-7] Essa classe de materiais é destinada a report tecido ósseo perdido ou guiar o crescimento desse tecido por através de uma área em um defeito ósseo. Quando um vidro do sistema $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ é adicionado à hidroxiapatita (HA) e o material conjugado é sinterizado, a fase vítrea reage com a HA. As fases presentes após a sinterização dependerão da temperatura de sinterização, da composição do biovidro e das frações HA-biovidro. [7-8] É particularmente interessante haver fases reabsorvíveis como os fosfatos tricálcios do tipo beta (β -TCP) e alfa (α -TCP), uma vez que essas fases são mais solúveis do que a HA. [7-8]

Os materiais porosos cerâmicos, vítreos e vitro-cerâmicos podem ser produzidos através de várias técnicas como a técnica da esponja polimérica, processo de agents espumantes e técnicas que utilizam aditivos orgânicos. [9-11] O principal requisito quanto à morfologia dos materiais porosos é a existência de porosidade aberta (inteconectiva) com diâmetros de poros superiores a 100 μm para permitir vascularização adequada. [12] Essa interconectividade pode ser alcançada com a adição de agents porogênicos, como aditivos orgânicos ou matrizes porosas. No entanto, há um compromisso entre porosidade e resistência mecânica. [9]

Um material compósito denominado hidroxiapatita reforçada com vidro, “glass-reinforced hydroxyapatite, GR-HA”, é produzido pela adição de biovidros à HA. As fases presentes serão função da composição do biovidro, da fração de biovidro utilizada e da temperatura de sinterização. A bibliografia de biovidros e hidroxiapatitas reforçadas com biovidros é vasta e aponta a utilização de materiais com várias composições [11-17].

PESQUISA DESENVOLVIDA EM PORTUGAL

O biovidro de fração molar $0.75\text{P}_2\text{O}_5-0.15\text{CaO}-0.10\text{CaF}_2$ foi produzido através da fusão dos reagentes em cadinho de platina a 1450°C durante 1 h. O vidro foi vertido para água fria e moído em um almofariz de ágata. A moagem final ocorreu em um moinho de bolas do tipo planetário, em etanol, durante 12 horas. Após moagem o pó foi seco a 100°C durante uma noite e, posteriormente, desagregado em almofariz de ágata e crivado (peneirado) até tamanho inferior a $75\mu\text{m}$.

O biovidro assim produzido serviu de material de base para a produção de hidroxiapatitas reforçadas com biovidro. Os compósitos foram produzidos utilizando-se hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) comercial (batch P201, Plasma Biotal; Tideswell, U.K.) e produzindo-se mistura em etanol em moinho do tipo planetário durante 12 horas para se homogeneizar a mistura.

O compósito denominado GRHA (glass reinforced hydroxyapatite) foi utilizado para a produção de biocerâmicas porosas para preenchimento de defeitos ósseos [16-17].

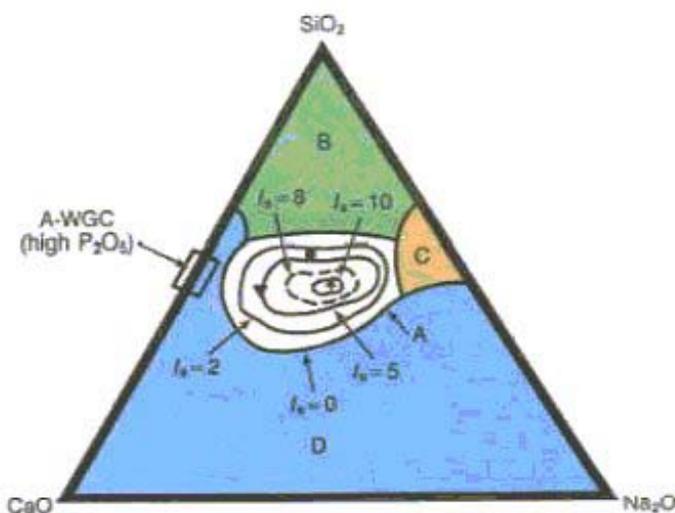


Figura 9 Diagrama para biovidros do sistema $\text{CaO-Na}_2\text{O-SiO}_2$ (L.L.HENCH).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. H. Prado da Silva, Ph. D. Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil (1999), 166.
- [2] M.P. Ferraz, J.C. Knowles, I. Olsen, F.J. Monteiro, J.D. Santos, *Biomaterials* 21 (2000) 813-820.
- [3] M.P. Ferraz, J.C. Knowles, I. Olsen, F.J. Monteiro, J.D. Santos, *J. Biomed. Mater. Res.* 47 (1999) 603.
- [4] M.P. Ferraz, F.J. Monteiro, J.D. Santos, *J. Biomed. Mater. Res.* 45 (1999) 376.
- [5] P.L. Silva, J.D. Santos, F.J. Monteiro, J.C. Knowles, *Surf. and Coat. Tech.*, 102 (1998) 191.
- [6] Y. Zhang, J.D. Santos, *J. Non-Cryst. Solids*, 272 (2000) 14.

- [7] J.D. Santos, R.L. Reis, F.J. Monteiro, J.C. Knowles, G.W. Hastings, J. Mater. Sci: Mat. Med. 6 (1995) 348.
- [8] J.D. Santos, L.J. Jha, F.J. Monteiro, J. Mater. Sci: Mat. Med. 7 (1996) 181.
- [9] A.F. Lemos, J.M.F. Ferreira, Mater. Sci. and Eng. 11 (2000) 35.
- [10] O. Lyckfeldt, J.M.F. Ferreira, J. Eur. Ceram. Soc. 18 (1998) 131.
- [11] J. Saggio-Woyansky, C.E. Scott, W.P. Minnear, Am. Cer. Soc. Bull. 71 (1992) 1674.
- [12] K. De Groot; C.P.A.T. Klein; J.G.C. Wolke, J.M.A. De Bleeck-Hogervorst, in: Hand. Bioact. Cer. Vol. 2 CRC Press Boca Raton FL (1990) 3.
- [13] J.C. Knowles, J.D. Santos, G.W. Hastings, Patent number WO0068164, 2000.
- [14] M. H. Prado da Silva, A. F. Lemos, J. M. F. Ferreira and J. D. Santos, Journal of Non-Crystalline Solids, 304 (2002), 286.
- [15] HENCH, L.L.; ANDERSSON, Ö., 1993, "Bioactive Glass Coatings". In: HENCH, L.L., WILSON, J. (eds), An Introduction to Bioceramics, 1 ed., chapter 13, Gainesville, USA, World Scientific.
- [16] M. H. Prado da Silva, A. F. Lemos, J. M. F. Ferreira and J. D. Santos, Key Engineering Materials, 230 (2002), 483.
- [17] M. H. Prado da Silva, A. F. Lemos, J. M. F. Ferreira and J. D. Santos, Proceedings of the European Society for Biomaterials Conference, (2001), T68.

II.2 TÉCNICAS DE RECOBRIMENTO

Os recobrimentos nos implantes osteointegrados são feitos com duas finalidades principais: criar uma superfície bioativa ou aumentar a rugosidade superficial. No caso da ênfase na rugosidade, são feitos recobrimentos com pó de titânio por aspersão térmica. Quando o objetivo é o aumento da bioatividade, é feito o recobrimento com cerâmicas bioativas e biovidros. Uma outra aplicação para os recobrimentos com fosfatos de cálcio é o recobrimento como transportador de proteínas ósseas morfogenéticas (DASARATHY *et al.*, 1996).

II.2.1 RECOBRIMENTO COM VIDROS BIOATIVOS

Os recobrimentos com vidros bioativos têm três objetivos principais:

- Proteger o substrato de corrosão;
- Proteger os tecidos de produtos de corrosão;
- Fornecer uma ligação interfacial boa com o tecido ósseo.

Quatro métodos são utilizados no processo de recobrimento com vidros bioativos (HENCH e ANDERSON, 1993):

- A. Esmaltagem: nesse processo, o vidro é fundido, homogeneizado e resfriado bruscamente e moído até se transformar em pó. Esse pó é aplicado sobre o metal através de pintura, aspersão ou imersão. A camada aplicada é aquecida a uma temperatura acima do ponto de amolecimento do vidro (400-600°C) onde o vidro se funde a uma camada de óxido do metal formando uma ligação mecânico-química na interface. A superfície externa do pó é sinterizada e forma uma camada coerente de vidro fundida ao metal. A fim de se obter essa camada aderente, é utilizada uma camada intermediária chamada camada de base, composta por uma mistura de vidro com óxido de Co ou Ni, que reage com o metal, geralmente aço. HENCH e colaboradores falharam na tentativa de conseguir uma camada de biovidro sobre uma camada de base. Essa falha se deveu à difusão de íons pela camada do biovidro, destruindo sua bioatividade. A solução encontrada tem sido a aplicação de duas camadas de vidro no substrato. A primeira provê ligação interfacial, enquanto a segunda, mantém sua bioatividade.
- B. Vitrificação: utilizada principalmente no recobrimento de alumina com biovidros. Um problema a ser superado é a diferença de coeficiente de expansão térmica. É feito um ajuste da composição química do vidro, o que destrói a bioatividade do vidro. A solução é aplicar duas camadas: a primeira camada, bastante delgada, é misturada a um solvente orgânico. Após a queima desse solvente a 650°C, o vidro é fundido à alumina a 1350°C durante 15 minutos. O resfriamento causa a formação de “ilhas” de vidro fundido à alumina com um gradiente de Al_2O_3 difundido para dentro do vidro. Uma segunda camada é aplicada e aquecida a 1150°C durante 30 minutos seguida de um resfriamento lento para aliviar as tensões entre as duas camadas. A segunda camada tem difusão de alumina limitada devido à temperatura de tratamento mais baixa. Logo, essa camada mantém sua bioatividade. A limitação desse processo reside na possibilidade de ocorrência de trincas, o que causa o desprendimento de lascas do recobrimento.

- C. Aspersão térmica à chama: o aparato para esse processo consiste basicamente de uma tocha da mistura oxigênio-hidrogênio ligada a um alimentador de pó, que passa por uma tocha na faixa de 3000°C. O pó rapidamente aquecido e fundido se choca contra o substrato onde se vitrifica. O controle das variáveis de faixa de amolecimento do vidro, taxa de têmpera e viscosidade do vidro produzem uma camada lisa e livre de bolhas.
- D. Imersão rápida: o substrato é aquecido para formar uma camada espessa de óxido. A seguir, o metal é imerso em um recipiente com biovidro fundido. O óxido é dissolvido no vidro formando uma ligação aderente entre o substrato e o biovidro. Nesse processo, é possível o ajuste da contração do substrato metálico à contração do vidro. O problema do recobrimento com biovidros é que a estrutura do biovidro permite o transporte de íons. Essa peculiaridade permite que se forme uma camada de carbonato apatita, criando sítios de ligação para o colágeno. Essa rede aberta também permite a liberação de íons de Fe, Mo, Cr, Co, Ni, Ti ou Ta. Se esses cátions estiverem presentes, eles reagem rapidamente com a superfície e previnem a formação da camada de fosfato de cálcio e sua recristalização em carbonato apatita, o que inibe ou elimina a bioatividade do vidro.

II.2.2 RECOBRIMENTOS COM FOSFATOS DE CÁLCIO

O termo “recobrimento com hidroxiapatita” deve ser utilizado somente quando se tem certeza da composição exata do fosfato de cálcio em questão. Mesmo considerando-se uma única técnica, por exemplo, aspersão térmica, camadas com propriedades bastante distintas podem ser obtidas. Isso vai depender dos parâmetros operacionais do processo e essa heterogeneidade pode influenciar as propriedades de dissolução das camadas (PASCHALIS *et al.*, 1995). Outros autores reportaram técnicas de recobrimento que produzem camadas mais homogêneas e menos espessas do que as produzidas por aspersão térmica (ZHOU *et al.*, 1996; DEPTULA *et al.*, 1996; MIZUSHIMA *et al.*, 1996; ANDERSON *et al.*, 1997).

As propriedades mecânicas das biocerâmicas são limitadas em relação a solicitações em tração. Para superar essa limitação, são feitos recobrimentos de metais com biocerâmicas, ao invés de confeccionar-se o implante com a biocerâmica. Esses recobrimentos são feitos através de várias técnicas, dentre elas: banho do metal em cerâmica fundida, aspersão térmica, deposição por eletroforese, deposição por pressão isostática a quente e deposição por bombardeio iônico assistido (KLEIN *et al.*,

1993; DE GROOT, 1998, DE ANDRADE *et al.*, 1998A, DE ANDRADE *et al.*, 1998B; DE ANDRADE *et al.*, 1999).

A. DEPOSIÇÃO POR LASER PULSADO

A deposição por laser pulsado é feita irradiando-se um pedaço de hidroxiapatita colocado em uma câmara de vácuo com pulsos de uma fonte de laser. A câmara é evacuada a 10^{-6} mbar e preenchida com vapor d'água até que se alcance a pressão de trabalho (0,45mbar). O feixe de laser, (ArF, $\lambda=193\text{nm}$), operando a uma taxa de repetição de 20Hz, é focado sobre o pedaço de hidroxiapatita, alcançando uma densidade de energia de $0,8\text{mJcm}^{-2}$. As placas de titânio são colocadas a uma distância de 5mm da hidroxiapatita e mantido a 455°C durante a deposição por meio de uma lâmpada de halogênio. O substrato é desengordurado com acetona e passivado com ácido nítrico em solução aquosa em banho ultra-sônico. A hidroxiapatita é depositada sobre o implante de titânio seguindo os contornos do implante (GARCÍA-SANZ *et al.*, 1997).

B. BANHO DE METAL EM CERÂMICA FUNDIDA

O banho em cerâmica fundida envolve a fusão da cerâmica e a imersão do implante nesse banho. Como desvantagem, tem-se as altas temperaturas envolvidas, o que pode causar a degradação da cerâmica e alterações no metal base. Uma outra desvantagem é a dificuldade em se recobrir pequenos poros no metal.

C. DEPOSIÇÃO POR PROCESSOS ELETROQUÍMICOS

Existem vários processos eletroquímicos de deposição que oferecem uma alternativa aos processos que envolvem altas temperaturas e equipamentos caros. Os principais processos eletrolíticos são:

C.1 DEPOSIÇÃO POR ELETROFORESE

A deposição por eletroforese envolve a aplicação de um campo elétrico a uma suspensão de partículas de hidroxiapatita em álcool ou água. Nesse método, a alteração do material de partida é mínima. Uma aplicação desse método é em implantes com superfícies irregulares ou porosas, onde outros processos não alcançariam. No entanto, como as partículas são depositadas individualmente, sem ligação umas com as outras, é necessário que se faça a sinterização do implante

recoberto. A ligação com o implante é fraca. Logo, esse método é mais aplicado a implantes onde a presença do recobrimento é necessária somente durante um curto período de tempo, como implantes porosos. Vários autores (MODGIL e DAMODARAN, 1993; ASAOKA, 1996; ASAOKA et al., 1996) reportaram a obtenção de depósitos uniformes sobre substrato de titânio. No entanto, a adesão aparece como fator limitante desse processo. Em trabalho recente, (PRADO DA SILVA *et al.* 1998; GIBSON *et al.*, 1999), foi desenvolvida uma técnica eletrolítica de recobrimento com hidroxiapatita que promove camadas com maior aderência ao substrato do que aquelas obtidas pelo processo de eletroforese.

C.2 DEPOSIÇÃO ELETROLÍTICA

Os processos eletrolíticos de deposição de fosfatos de cálcio são relativamente simples, rápidos e envolvem baixos custos. O substrato, geralmente titânio, é utilizado como catodo ao passo que utiliza-se como anodo geralmente platina. Os dois eletrodos são imersos em um eletrólito contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} e ligados a uma fonte que aplica uma diferença de potencial entre eles. O processo pode ser conduzido com ou sem agitação mecânica e a várias temperaturas. A boa adesão do depósito ao substrato aparece como uma das principais vantagens dos processos eletrolíticos (DASARATHY *et al.*, 1996; PRADO DA SILVA *et al.*, 1998; GIBSON *et al.*, 1999).

REDEPENNING *et al.* (1996) obteve um depósito de brushita sobre titânio puro que foi posteriormente convertido em hidroxiapatita. Esse resultado serviu de base para o desenvolvimento da técnica de deposição de hidroxiapatita em substrato de titânio pelo processo eletrolítico utilizada nesse trabalho (PRADO DA SILVA *et al.*, 1998; GIBSON *et al.*, 1999; DA SILVA *et al.*, 1999A). A composição química, morfologia e adesão dos fosfatos de cálcios depositados pelos processos eletrolíticos são dependentes de vários fatores, dentre eles o valor de pH da solução (SHIRKHAZADEH, 1998; ASAOKA, 1996; ASAOKA et al., 1997).

D. DEPOSIÇÃO BIOMIMÉTICA

O processo de deposição biomimética se baseia na precipitação heterogênea sobre substratos de titânio ativados. A superfície do titânio é tratada em uma solução alcalina, geralmente NaOH, e posteriormente tratada termicamente. Esse procedimento ativa a superfície do metal, acelerando a nucleação e crescimento de fosfatos de cálcio (SOARES et al., 1997; DE ANDRADE et al., 1998A). A nucleação e

crescimento do recobrimento de apatita se dá após imersão em uma solução salina balanceada (solução de Hank's ou SBF), a 37°C por vários dias (DE GROOT, 1998). Esse processo se assemelha ao processo de biomineralização óssea (LAYROLLE *et al.*, 1998).

E. DEPOSIÇÃO POR PRESSÃO ISOSTÁTICA A QUENTE

Nesse método, o pó do material que vai recobrir o metal é prensado a quente para se densificar. Para garantir uma pressão uniforme sobre a superfície do metal, é utilizado um material para encapsular, geralmente um metal nobre. Uma vantagem desse método é a utilização de temperaturas inferiores às temperaturas utilizadas na sinterização, já que as temperaturas nesse processo são inferiores a 900°C. Esse fato contribui para que as propriedades do substrato metálico e do pó prensado não sejam alteradas. WIE *et al.* (1995), comparando implantes recobertos por esse processo e por aspersão térmica, reportou a ausência de decomposição da hidroxiapatita em fases secundárias.

F. DEPOSIÇÃO POR BOMBARDEIO IÔNICO

Os métodos de deposição por bombardeio de feixe iônico e bombardeio por radiofrequência consistem no bombardeio de um metal alvo por um feixe iônico em uma câmara de vácuo. Os alvos do material a recobrir são bombardeados formando um filme fino sobre o metal. No caso do recobrimento com hidroxiapatita, os átomos individuais de Ca, P, O e H são depositados formando um material amorfo. É requerido um tratamento térmico para fornecer energia suficiente para que haja formação da hidroxiapatita cristalina. Essas camadas geralmente têm melhor adesão e melhores propriedades mecânicas do que as camadas mais espessas. No entanto, ainda são necessários estudos indicativos da durabilidade de camadas com espessuras inferiores a 1µm no corpo humano (LACEFIELD, 1993). Vários métodos alternativos têm sido testados no sentido de reproduzir as apatitas biológicas. Em estudo recente, Yamashita *et al.* (1996) reportaram o desenvolvimento de um método de deposição de apatita carbonatada do Tipo B, que é bastante semelhante às apatitas encontradas no esmalte dentário e no osso cortical.

G. ASPERSÃO TÉRMICA

As técnicas de aspersão térmica consistem em aspergir pó de um material sobre o substrato metálico. Uma tocha é utilizada para acelerar as partículas em direção ao alvo. O processo pode ser feito com a utilização de uma tocha de oxigênio a alta velocidade ou com uma tocha de plasma (gás ionizado). No primeiro processo, temperaturas mais baixas são utilizadas, o que evita a degradação da camada. Uma outra vantagem é que a maior velocidade permite que as partículas penetrem em irregularidades do implante. O processo de aspersão térmica a plasma (“plasma spraying”) é o mais estabelecido e o mais utilizado comercialmente de todos os métodos citados. Nesse processo, uma tocha de gás ionizado é empregada. A Figura 10 ilustra esquematicamente o processo de aspersão térmica a plasma. O gás utilizado é geralmente argônio que é ionizado ao passar pela zona de descarga de alta temperatura. Um plasma mais quente pode ser produzido através de pequenas adições de hidrogênio ou outros gases. A zona de descarga é gerada por um arco de corrente que é formado entre um anodo de cobre e um catodo de tungstênio. O bico do canhão de plasma é mantido refrigerado a água já que as temperaturas são da ordem de 10000°C. Como o período em que as partículas ficam na zona quente é muito curto, a fusão das partículas é somente parcial (LACEFIELD, 1993).

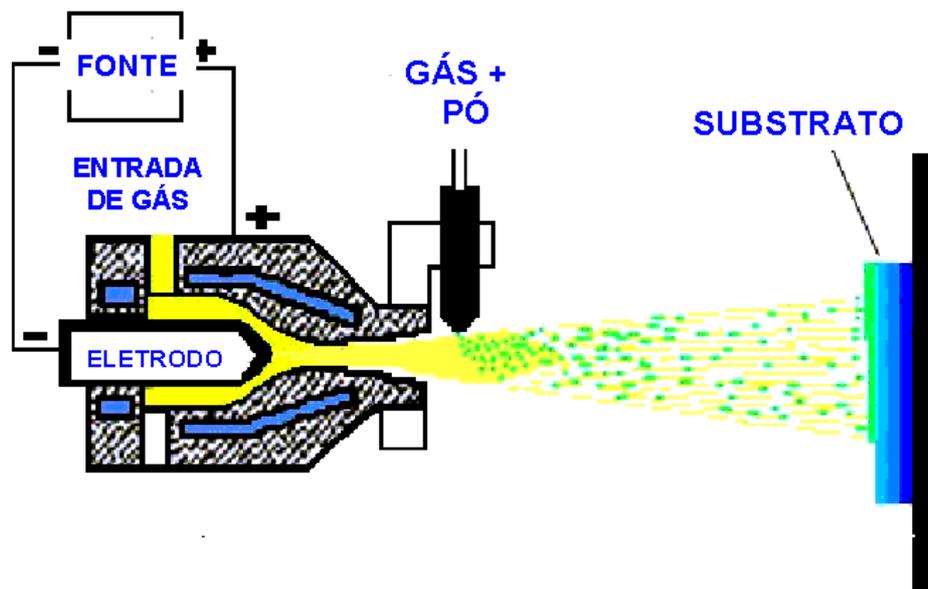


Figura 10 Esquema de recobrimento por aspersão térmica a plasma.

As principais variáveis no recobrimento por plasma são:

- distância do substrato à tocha de plasma;
- corrente;
- distância entre anodo e catodo;
- mistura gasosa empregada;
- posição em que as partículas entram no plasma.

Apesar da alta temperatura do processo, o substrato fica a uma temperatura relativamente baixa, da ordem de 300°C, o que representa uma vantagem já que o substrato metálico não sofre alterações mecânicas. O recobrimento com hidroxiapatita é feito geralmente sob pressão atmosférica, ao passo que recobrimentos com pós metálicos são feitos sob vácuo ou em atmosferas inertes. No recobrimento com hidroxiapatita, as partículas são 100% cristalinas, na faixa de 20-40µm. Quando estas colidem com o substrato, são deformadas em um formato característico chamado “splats”, que consistem em partículas espriadas sobre a superfície. A espessura final do recobrimento costuma ser da faixa de 40-60µm. Essa camada geralmente contém porções consideráveis de fosfatos de cálcio amorfos e uma pequena porção de fases cristalinas como hidroxiapatita. É possível aumentar-se a cristalinidade e a resistência da ligação da camada ao substrato através de tratamentos térmicos. No entanto, esse tratamento nem sempre é viável por várias razões: efeitos adversos no substrato, custos adicionais ao processo e possibilidade de contaminação da hidroxiapatita (LACEFIELD, 1993). O recobrimento resultante não sofre delaminação porque a mesma é composta de uma infinidade de microtrincas. Microscopicamente, o recobrimento por aspersão térmica consiste em várias áreas aderidas ao substrato. Logo, quando o mesmo se deforma, não ocorre delaminação da camada como um todo (WILLMANN e WIMMER, 1993).

No processo de plasma, não há restrições quanto à natureza do metal a ser recoberto; o único requisito é que a superfície metálica seja rugosa. Para materiais poliméricos, no entanto, há restrições quanto à temperatura do processo, já que altas temperaturas podem acarretar degradação das propriedades do polímero e estas podem comprometer a biocompatibilidade (WILLMANN, 1997).

Os recobrimentos com hidroxiapatita são, de maneira geral, regidos pela norma ASTM F 1185-88, que estabelece a faixa de 50-250µm para a espessura da camada

depositada. No entanto, ainda há muita discussão sobre normalização (LEMONS e GREENSPAN, 1993). WILLMANN e WIMMER (1993) estabeleceram que quanto maior a espessura, menor será a resistência da camada. Esses autores encontraram valores superiores a 35MPa para camadas de espessura de 200 μ m e superiores a 90Mpa para espessuras de 50 μ m, confirmando a tendência do aumento da resistência mecânica das camadas com a diminuição da espessura das mesmas. Se o processo de aspersão térmica for bem controlado, a camada de hidroxiapatita deve exibir as seguintes propriedades:

- A percentagem de fases minerais deve ser superior a 98%;
- A camada deverá exibir uma porosidade aberta;
- A resistência ao cisalhamento deverá ser superior a 35MPa para espessura de 200 μ m.

A Tabela 5 lista algumas propriedades importantes dos recobrimentos de hidroxiapatita produzidos por aspersão térmica.

Tabela 5 Propriedades típicas da hidroxiapatita cerâmica (WILLMANN e WIMMER, 1993).

Propriedades	Valores Padrão	Observações
Densidade teórica	3,16g/cm ³	Valor ideal, raramente obtido na prática
Resistência à compressão	100-200MPa	Considerando-se a densidade teórica de 3,16g/cm ³
Resistência à flexão	100MPa máx.	
Tenacidade à fratura	1MPa m ^{1/2}	Frágil como vidro de janela
Módulo de Young	100GPa máx.	Sob alta densidade
Dureza	500 HV	(valor padrão)
Expansão térmica	11x10 ⁻⁶ K ⁻¹	
Ponto de fusão	1650°C	Decomposição!
Resistência à corrosão		Aumenta em pHs altos

II.3 IMPLANTES ODONTOLÓGICOS

As razões pelas quais são empregados procedimentos cirúrgicos reconstrutivos que envolvem implantes variam consideravelmente mas podem ser identificadas como (WILLIAMS, 1992B):

- substituição de um dente perdido por cárie, doença periodontal ou trauma;
- substituição de osso perdido por um processo de reabsorção relacionado a distúrbios nos campos de tensão ou periodontite induzida por bactéria;
- perda tecidual devido a tumores;

Três tipos principais de implantes têm sido usados: totalmente sepultos, subperiósticos e endoósseos (DE GROOT, *et al.* 1990).

- Implantes totalmente sepultos: a não existência de evidências científicas que justificassem essa técnica fez com que caíssem em desuso;
- Implantes justa-ósseo ou subperiósticos: Consistem em uma estrutura fundida moldada ao osso maxilar, com projeções na cavidade oral, onde é fixada a prótese. São utilizados principalmente em mandíbula atrófica. Essa técnica permite bons resultados a curto prazo. A interface osso-implante é do tipo fibrosa, o que faz com que em períodos acima de 15 anos, a ocorrência de fracasso seja grande;
- Implantes endoósseos: os implantes osteointegrados são inseridos no osso maxilar ou mandibular. Esses implantes podem ser recobertos ou não com materiais bioativos e a cirurgia de implantação pode ser feita em uma ou duas etapas. Esses implantes foram desenvolvidos por P. I. BRANEMARK e colaboradores e levou ao desenvolvimento de diferentes geometrias (DE GROOT, *et al.* 1990). A maior quantidade de informações clínicas sólidas está relacionada ao sistema sueco Branemark de implantes osteointegrados.

II.3.1 CLASSIFICAÇÃO DOS IMPLANTES ENDOÓSSEOS:

A. QUANTO À GEOMETRIA E AO ACABAMENTO DA SUPERFÍCIE

Os implantes endoósseos do tipo osteointegrados oferecem um alto índice de sucesso, de forma que existe no mercado um grande número, que continua

crescendo, de sistemas de implantes. Esses implantes podem ter a forma de cilindros, lâminas, parafusos, cones, ou até mesmo imitar a geometria da raiz de um dente.

Os primeiros implantes utilizados tinham o formato de lâminas com furos ou reentrâncias para promover aposição mecânica do tecido ósseo e eram genericamente conhecidos como “blade vent”. Esses implantes eram inseridos em cavidades cuidadosamente preparadas no osso do paciente. Após o fracasso dos implantes blade-vent, surgiram os implantes transósseos (atravessavam a mandíbula), que se assemelhavam a um grampo mandibular. Esse tipo de implante era restrito à mandíbula e requeria espessura óssea adequada. Uma grande desvantagem era o alto risco de infecção.

O implante de desenho cilíndrico ou cônico é atualmente sinônimo de implante odontológico. O implante cilíndrico pode ser rosqueado ou não. Quanto ao acabamento superficial, os implantes podem ser de titânio puro ou recobertos, sendo que os implantes de titânio puro podem ser lisos ou rugosos. Os recobrimentos são geralmente feitos com material bioativo, principalmente hidroxiapatita. No entanto, são encontrados também implantes recobertos com pó de titânio por aspersão térmica a plasma, visando o aumento da rugosidade superficial. Os implantes de titânio puro rugosos recebem vários tipos de tratamentos de superfície para criar essa rugosidade, como jateamento com partículas duras de óxidos e ataques químicos com ácido. Os óxidos mais utilizados no jateamento são Al_2O_3 , SiO_2 e TiO_2 . A Figura 11 apresenta algumas das várias geometrias de implantes disponíveis atualmente.



Figura 11 Principais geometrias e acabamentos superficiais de implantes disponíveis (SPIEKERMANN, 1995).

B. QUANTO À FIXAÇÃO AO OSSO

Quanto à fixação ao osso, os implantes odontológicos do tipo osteointegrados podem ser classificados em quatro categorias principais: implantes do tipo 1, que são aqueles feitos de material inerte e que não fazem nenhuma ligação com o osso; implantes do tipo 2 são os implantes porosos, onde o osso cresce por entre as reentrâncias, promovendo uma fixação mecânica. Os implantes do tipo 3 são bioativos e formam ligação com o osso através de reações químicas na interface. No tipo 4 recaem os implantes reabsorvíveis, que após algum tempo de inserção, são substituídos pelo osso (HENCH e WILSON 1993).

Implantes do tipo 1: esses implantes são feitos de materiais inertes e não fazem nenhuma ligação com o osso. A interface osso-implante consiste em tecido fibroso e esse tipo de implanta não apresenta estabilidade a longo prazo.

Implantes do tipo 2: essa categoria abrange implantes feitos de materiais bioinertes e implantes feitos de materiais bioativos. Nessa categoria de implantes, se enquadram os implantes de cerâmicas porosas e recobertos com hidroxiapatita sobre metais porosos. Neste caso, a ligação com o osso é mais complexa e envolve fatores mecânicos e de bioatividade. Esse tipo de ligação é comumente chamado de fixação biológica. Uma limitação desse tipo de implantes é quanto ao tamanho mínimo dos póros. Estes devem possuir diâmetro superior a 100 μ m, que é o tamanho de póro mínimo necessário para que os capilares supram o tecido que crescerá dentro dos póros.

Implantes do tipo 3: esses implantes fazem um tipo de fixação que é intermediária entre os implantes reabsorvíveis e os bioinertes. Nesses implantes, é formada uma camada de carbonato apatita que é equivalente em composição e estrutura à fase mineral do osso. Essa camada cresce como aglomerados policristalinos e fibras de colágenos são incorporadas à estrutura, ligando o implante inorgânico aos tecidos. A interface gerada é bastante semelhante àquela que ocorre entre o osso e os tendões e osso e ligamentos, tanto em termos de constituintes quanto em termos de distribuição de tensões.

Implantes reabsorvíveis do tipo 4: os implantes reabsorvíveis são projetados para se degradarem a uma taxa igual à taxa de reparação do organismo. O resultado final deve ser uma camada muito fina ou inexistente do material reabsorvível. A limitação

desse tipo de implante é a obtenção de um bom desempenho mecânico durante o período de regeneração, ou seja: bom desempenho mecânico a curto prazo. Os melhores materiais para implantes reabsorvíveis são: fios de sutura compostos de poli (ácido lático) ou poli (ácido glicólico), que são metabolizados em dióxido de carbono e água; fosfato tricálcio, que é decomposto em sais de cálcio e fosfato e podem ser usados para preenchimento ósseo.

C. QUANTO À CIRURGIA

Os implantes odontológicos podem ser classificados, quanto aos estágios de cirurgia, em implantes de 1 ou 2 estágios cirúrgicos.

Implantes de 1 estágio: os implantes de 1 estágio são inseridos no leito receptor e de lá emerge para a cavidade oral. O tecido gengival que recebeu a incisão para se ter acesso ao osso é suturado cuidadosamente ao redor do implante. O implante permanece sem carregamento durante o período de regeneração óssea até que seja inserida a prótese sobre a porção do implante que está exposta. Um exemplo de implante de um estágio é o implante Tübingen, que é feito de alumina pura e tem a geometria de cones que dão ao implante um aspecto de degraus decrescentes. A sua superfície contém ranhuras longitudinais e póros circulares, para promover aposição mecânica de osso. Esse sistema de implantes é utilizado principalmente em substituições de dentes unitários. A maioria dos implantes cilíndricos é feita de titânio puro ou de liga de titânio, especialmente a liga Ti-6Al-4V. Um exemplo de implante cilíndrico de 1 estágio é o sistema ITI, que é de titânio puro de superfície porosa (WILLIAMS, 1992B).

Implantes de 2 estágios: os implantes desse tipo são inseridos no leito receptor, porém ficam totalmente submersos na mucosa. Esses implantes permanecem assim, protegidos de solicitações mecânicas e de interações com o meio exterior enquanto o tecido ósseo se regenera. Esse período varia de 16 a 18 semanas para osso mandibular e 20 a 24 semanas para maxila. Após esse período, a mucosa é reaberta e a prótese é fixada sobre o implante.

O exemplo mais notório de sistema de implante de dois estágios é o sistema Nobelpharma (Branemark). Esse implante é um cilindro rosqueado confeccionado em titânio comercialmente puro. Esse sistema de implante é recomendado para pacientes totalmente edêntulos. Para cada arcada, são indicados em torno de seis implantes,

dependendo da anatomia de cada paciente. O acesso ao osso é feito com uma broca, sob baixa rotação e irrigação farta, para evitar sobreaquecimento e subsequente necrose do tecido ósseo. O furo é então rosqueado com o auxílio de um macho e os implantes são inseridos. O torque utilizado na inserção dos implantes deve ser minimizado e uma pequena cobertura é colocada sobre as terminações de cada implante. A cavidade é fechada e o implante permanece protegido durante o período de regeneração. Após o período de regeneração, as coberturas são removidas e são colocados abutments, que são os componentes que fazem a ligação do implante com a prótese. A mucosa é suturada ao redor dos “abutments” e o tratamento protético é começado poucas semanas mais tarde. A Figura 12 apresenta os componentes básicos do sistema Branemark

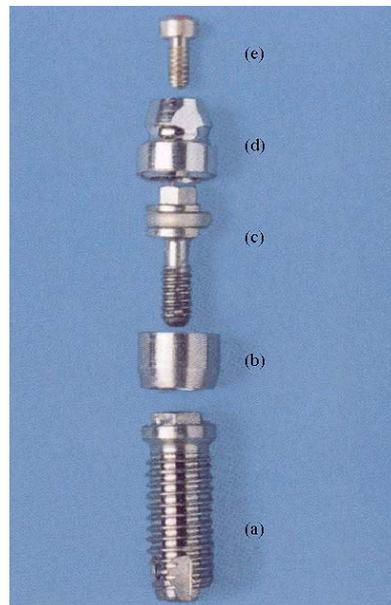


Figura 12 Componentes de um sistema Branemark: (a) implante, (b) pilar prolongador, (c) parafuso do pilar, (d) cilindro de ouro, (e) parafuso de ouro (SPIEKERMANN, 1995).

O sistema Core-Vent, projetado tanto para substituições de dentes unitários quanto para pacientes totalmente edêntulos, é confeccionado com uma liga de titânio com superfície porosa. A Figura 13 apresenta alguns sistemas de implantes do tipo core-vent.



Figura 13 Sistema de implantes Biolox e Oraltronics (SPIEKERMANN, 1995).

O sistema IMZ também emprega implantes cilíndricos para substituições unitárias ou múltiplas. Porém, esse sistema possui algumas características peculiares: esses implantes são multi-componentes e possuem um componente polimérico que é projetado para conferir ao conjunto um grau de resiliência. O sistema Calcitek Omnilock possui implantes cilíndricos recobertos com hidroxiapatita. Esses implantes apresentam perfurações na extremidade para promover fixação mecânica. As Figuras 14 e 15 apresentam vários sistemas de implantes que utilizam cilindros lisos e rosqueados.

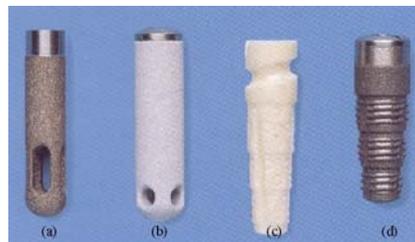


Figura 14 Implantes cilíndricos: (a) IMZ, (b) Calcitek, (c) Frialit-1, (e) Frialit-2 (SPIEKERMANN, 1995).

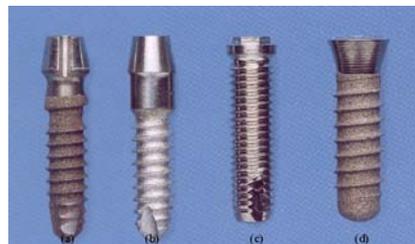


Figura 15 Implantes cilíndricos rosqueados: (a) antigo ITI de peça única, recoberto por plasma de titânio, (b) implante de Ledermann, jateado e posteriormente atacado com ácido, (c) Branemark, (d) implante ITI, recoberto por plasma de titânio (SPIEKERMANN, 1995).

II.4 INTERAÇÕES OSSO-IMPLANTE

O primeiro tecido a entrar em contato com o implante é o sangue, cujo volume envolvendo o implante vai variar em função da geometria do implante e do sítio cirúrgico. O coágulo sofrerá uma série de eventos biológicos que terminarão na formação de tecido ósseo ao redor do implante. O implante entrará em contato com percentagens variáveis de osso cortical, osso trabecular e medula óssea. Algumas áreas estarão comprimindo o tecido ósseo enquanto outras estarão em contato com sangue e uma variedade de células. Essa característica aponta para o fato de haver na verdade várias interfaces com o implante (MASUDA *et. al.*, 1997).

As células não vêm um material “nu” *in vivo* ou *in vitro*. A todo momento, o material está condicionado pelos componentes do fluido onde está inserido, seja soro, saliva, ou meio de cultura de células. A superfície do biomaterial estará coberta com uma mistura de lipídios, açúcares, íons e proteínas específicos para a composição química, topografia e a densidade de carga do substrato. As características da superfície determinarão quais moléculas irão adsorver, ao passo que a natureza e orientação dessas biomoléculas terão consequências diretas no recrutamento, ancoragem, proliferação e diferenciação das células. A ancoragem das células requer a presença de proteínas de ligação específicas, enquanto a proliferação e diferenciação requerem que fatores de crescimento e citocinas estejam presentes (BOYAN *et al.*, 1996).

Para um entendimento das interações dos diferentes biomateriais com os tecidos hospedeiros, é necessário um estudo do fenômeno da osteointegração, da fisiologia do osso e das propriedades que regulam a ligação osso-implante.

II.4.1.1 EMBASAMENTO CELULAR DA OSTEOINTEGRAÇÃO

Foi destacado que uma das condições indispensáveis ao sucesso da osteointegração é a presença de tecido ósseo viável. É portanto necessária a presença das células que tomam parte nesse processo. São elas: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células indiferenciadas, precursoras dos osteoblastos. Estas últimas serão estimuladas para a induzir formação de tecido ósseo (osteogênese).

Quando o osso é traumatizado por ocasião da inserção do implante, ocorre a formação de um coágulo. Portanto, é necessário também a formação de uma certa quantidade de tecido mole (capilares). O trauma operatório irá sensibilizar células que irão liberar determinados fatores de crescimento que estimularão novas células. O equilíbrio entre a formação de tecidos moles e de novo osso é influenciado pelos mediadores liberados por estas células. Esse equilíbrio entre os elementos teciduais envolvidos é que dita o sucesso ou não da reparação. Influências externas como aplicação de carregamento antes do tempo, alterações de pH ou da saturação de O₂ podem perturbar a reparação óssea (MASUDA *et al.*, 1998).

Ao mesmo tempo em que a injúria estimula a resposta à reparação, um trauma muito severo pode levar a danos permanentes nos tecidos, impedindo a reparação.

Existem três diferentes linhas que postulam que o estímulo adequado à reparação óssea baseia-se no contato: célula-célula, moléculas solúveis da matriz ou potenciais elétricos gerados por tensões. No primeiro caso, acredita-se que as células são capazes de emitir um sinal químico que irá influenciar as células adjacentes indiferenciadas a se diferenciarem em pré-osteoblastos. Portanto, segundo essa teoria, haveria uma competição entre os fatores de reparação dos tecidos envolvidos. No segundo caso, a substância básica é enfatizada. Dessa maneira, as células indiferenciadas seriam estimuladas pelos componentes da matriz. A terceira teoria é a de que o sinal elétrico liberado pelo efeito piezoelétrico do osso vá deflagrar a resposta à reparação (HOBKIRK e WATSON, 1996).

Para uma compreensão mais ampla do fenômeno da osteointegração bem como dos fatores que podem favorecê-la, é preciso um estudo dos materiais em questão, que são: tecido ósseo, líquidos corporais e o material da superfície de implantes. Esse estudo abrange áreas multidisciplinares que envolvem biologia, odontologia engenharia de materiais, química, engenharia mecânica, entre outras. Os capítulos subsequentes abordarão mais detalhadamente a fisiologia do osso, os materiais usados em implantes e suas propriedades de superfície, a natureza da ligação osso-implante e as técnicas de avaliação *in vivo* e *in vitro* de implantes.

II.4.2 FISILOGIA DO OSSO

A. INTRODUÇÃO

O osso cortical é uma forma densa e especializada de tecido conectivo onde células chamadas osteócitos se encontram inseridas. As células vivas respondem por 15% do peso do osso e são responsáveis pelo processo incessante de remodelamento: enquanto uma classe de células chamadas osteoclastos erode o osso velho, outra chamada de osteoblastos deposita matriz óssea recém-formada. A matriz óssea é composta de fibras de colágeno, cristais de um fosfato de cálcio complexo e uma substância de base ou cimento, que compreende um número de componentes incluindo mucopolissacarídeos. Esta matriz é permeada por uma rede de cavidades e canais onde ficam os osteócitos (ALBERTS *et al.*, 1989).

Como o osso é uma mistura de fibras tenazes (fibrilas de colágeno do tipo I) e partículas sólidas (cristais de fosfato de cálcio), ele apresenta boa resistência tanto a cargas compressivas quanto a cargas trativas. O osso pode assumir diferentes morfologias e funções, de acordo com sua localização no esqueleto humano.

O osso cortical, também chamado osso compacto, é duro e forte e pode ser encontrado na superfície de ossos planos ou entre as duas extremidades de ossos longos em mamíferos, onde é característico do córtex ósseo. Logo, o nome osso cortical. No osso cortical, os canais vasculares são muito estreitos de forma que o osso cortical é macroscopicamente sólido.

Por outro lado, no osso trabecular grosseiro, esses canais são muito mais largos, variando de um milímetro a um centímetro ou mais de diâmetro. No osso trabecular fino, o componente vascular é também dominante, mas a textura é bem mais fina e este somente pode ser observado com um microscópio. Além da função de sustentação, uma outra função que os diferentes tipos de osso possuem é a de proteger o tecido vital. Exemplos são: o crânio protegendo o cérebro; a coluna vertebral protegendo o sistema nervoso central e o osso trabecular protegendo a medula óssea onde novas células ósseas podem migrar a partir do tecido hematopoiético para os vasos sanguíneos de paredes finas e tomar parte na circulação do corpo.

Os constituintes do osso estão em equilíbrio dinâmico, já que há células morrendo e sendo repostas; adicionalmente, a fase mineral e o colágeno estão sempre sendo reabsorvidos e depositados durante a vida adulta saudável. Esse processo permite a manutenção da forma e volume dos ossos e é chamado de remodelamento. A fase mineral do osso compreende 70% de seu peso e consiste basicamente de cristais de apatita. O osso representa o maior reservatório de cálcio do corpo humano. Conseqüentemente, além das funções de sustentação e proteção de tecido vital, ele desempenha um terceiro papel, no metabolismo, realizando a troca de minerais com o sangue. A quarta função do osso é como um filtro para uma variedade de íons gerados no sangue que podem substituir íons de cálcio ou ser incorporados à rede dos cristais de apatita, ou ainda serem aderidos à matriz orgânica (SOMCHAI, 1992). As propriedades mecânicas do osso cortical estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 Propriedades Mecânicas do Osso Cortical (SOMCHAI, 1992).

PROPRIEDADES MECÂNICAS	LONGITUDINAL (L)	TRANSVERSAL (T)
Lim. Res. a compressão (MPa)	70-280	53
Lim. Res. a tração (MPa)	70-160	50-53
Módulo de Young (GPa)	11-21	5-13
microdureza (VPN)	30-60	-
Tenacidade à fratura (MPa.m)	2-5	8

B. MACROESTRUTURA DO OSSO

A macroestrutura do osso consiste em osso cortical, osso trabecular, medula óssea e vasos sanguíneos. O osso cortical é composto de sistemas Haversianos ou osteons, onde as lamelas estão arranjadas concentricamente em torno de canais contendo um ou mais vasos sanguíneos (Canais de Haversianos). Essas estruturas tubulares correm longitudinalmente e estão empacotadas juntas, tendo os interstícios preenchidos com o restante dos osteons velhos. Os limites dos osteons são demarcados por linhas de cemento da mesma forma que o são algumas lamelas em osso trabecular e algumas lamelas circunferenciais. As fibras de colágeno também podem estar orientadas randomicamente formando uma estrutura entrelaçada. Isso ocorre em osso imaturo e em algumas condições patológicas. Ossos recém-formados têm um depósito de colágeno não mineralizado sobre as suas superfícies. Este depósito é uma camada bastante fina e está ausente quando ocorre reabsorção.

Na maioria dos mamíferos, o osso cortical é formado de fibras finas, mas nos invertebrados inferiores, ele pode ser composto principalmente de fibras grosseiras.

A formação de osso compacto novo é obtida por três mecanismos ocorrendo simultaneamente (BOURNE, 1972):

- a) parcialmente pela consolidação de osso trabecular fino, onde cilindros de osso novo chamados de osteons são formados nos túneis vasculares;
- b) parcialmente como uma formação direta de osso sólido no perióstio e medula de qualquer osso plano existente;
- c) parcialmente no processo de remodelamento de osso compacto existente, onde os túneis são erodidos e preenchidos novamente com cilindros de osso chamados de osteons secundários.

Osso trabecular, também chamado de osso esponjoso ou medular, é encontrado nas extremidades e cavidades medulares de ossos longos, bem como nas vértebras e no centro de ossos planos. Embora tenha baixa resistência mecânica, o osso trabecular tem um arranjo que funciona muito bem como uma estrutura de amortecimento de peso. O osso trabecular pode ser dividido em duas variedades principais: osso trabecular fino e osso trabecular grosseiro. O osso trabecular fino é encontrado no esqueleto de fetos ou em ossos novos patologicamente induzidos. O osso trabecular grosseiro é encontrado no esqueleto adulto de mamíferos. Ele tem uma estrutura de colméia com vasos sanguíneos e gordura no interior das trabéculas. A medula é permeada com vasos sanguíneos, sendo uma fonte de nutrientes que viajam para as lacunas localizadas no osso trabecular.

C. MICROESTRUTURA DO OSSO

Nos seres humanos e mamíferos superiores, o arranjo dos constituintes do osso dão origem a duas microestruturas ósseas principais: osso entrelaçado ou de fibras grosseiras e osso lamelar ou de fibras finas (HANCOX, 1972).

A microestrutura do osso é composta de osso primário ou entrelaçado, osso secundário ou lamelar e células ósseas. O osso entrelaçado apresenta espaços grandes contendo gordura, vasos sanguíneos e tecido conectivo. Esses espaços são envolvidos por matriz óssea, onde os osteócitos estão randomicamente distribuídos. A

estrutura que é observada quando amostras histológicas são preparadas é conhecida como trabécula e corresponde à vista plana da matriz óssea circundante.

Embora o osso entrelaçado seja um material efêmero e seja reabsorvido e substituído por osso lamelar, ele também é encontrado em locais de ligação de tendões e ligamentos, em raiz de dentes e nas margens de sutura dos ossos do crânio. Nos ossículos da orelha, algum osso entrelaçado é dito persistir por toda a vida. Osso trabecular entrelaçado é formado em calos em torno de uma fratura e em alguns ossos em desenvolvimento. Osso compacto entrelaçado é formado em áreas de diáfise de ossos em desenvolvimento. O osso lamelar tem lamelas Haversianas ou concêntricas com vasos sanguíneos em canais vasculares localizados no seu centro. Esses canais vasculares juntamente com suas lamelas associadas constituem os sistemas Haversianos, onde os osteócitos são arranjados concentricamente com os canais. Cada lamela contém fibras finas de colágeno aproximadamente paralelas umas às outras. Entre essas fibras, há substância de base amorfas e cristais de apatita.

Ambos os ossos entrelaçado e lamelar podem conter canais vasculares esparsos, dando origem a osso compacto ou denso ou podem conter canais largos, formando osso trabecular ou esponjoso. A Figura 16 mostra a microestrutura do osso cortical.

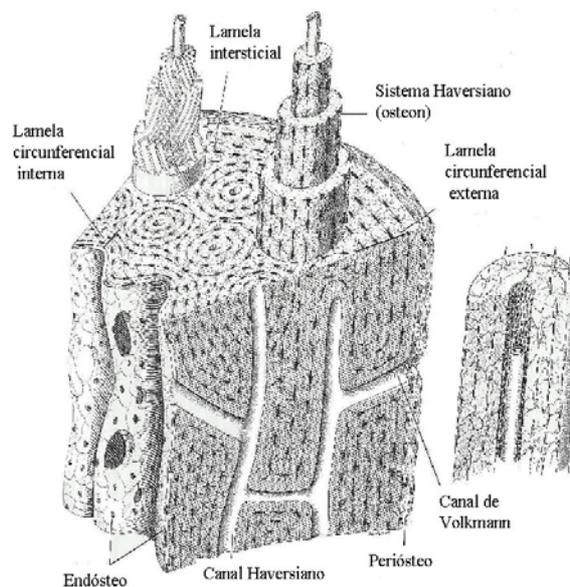


Figura 16 Vista esquemática do osso cortical (JUNQUEIRA *et. al.*, 1995).

Células ósseas: há três tipos de células ósseas distintas das células medulares que pertencem ao sistema hematopoiético. Elas são (HANCOX, 1972; JUNQUEIRA *et. al.*, 1995):

Osteoblastos: são células completamente diferenciadas que têm a função da formação de osso (osteogênese). Elas são as responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos matriz óssea (colágeno do tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas), bem como dos componentes inorgânicos. Estas células são vistas na superfície de ossos em formação, constituindo uma espécie de epitélio. Elas têm citoplasma basofílico e núcleo ecêntrico, distal em relação à superfície do osso. Os basófilos são devidos à presença de ácido ribonucleico. A atividade de síntese pode ser medida pela morfologia destas células: quando empenhadas na produção de matriz, elas têm citoplasma basofílico e um formato cuboidal a colunar, ao passo que quando a atividade de síntese diminui, elas se tornam planas e os basófilos citoplasmáticos diminuem. Estes processos citoplasmáticos se tornam mais evidentes quando essas células envolvem-se a si mesmas em matriz sintetizada nova. Quando isto ocorre, estas células são chamadas de osteócitos. A cavidade onde elas se encontram é chamada de lacuna e o espaço ocupado pelas extensões citoplasmáticas é chamado canalículo.

A matriz nova que é depositada na superfície de ossos mais velhos é chamada osteóide, e fica entre a superfície do osso mais velho e a camada de osteoblastos. Esta nova matriz não é calcificada ainda e a aposição de osso é completada quando os sais de cálcio são depositados nesta nova matriz.

Osteócitos: são células maduras (anteriormente osteoblastos) que se tornaram inclusas na matriz que eles formaram. Eles residem em pequenos espaços ou lacunas dentro do osso. Essas lacunas estão conectadas umas às outras e aos espaços vasculares por canalículos, pequenos canais dentro dos quais processos citoplasmáticos dos osteócitos se projetam. Através dos canalículos, passam fluidos e substâncias dissolvidas usadas e produzidas pelo metabolismo celular.

Osteoclastos: são células gigantes multinucleares cujos citoplasmas contêm numerosas mitocôndrias. Estas células agem como destruidoras do osso e podem ser vistas em pequenos grupos ou isoladamente em superfícies que estão sendo erodidas ou reabsorvidas. Elas são geralmente encontradas em cavidades na superfície do osso (lacunas de Howship). É sugerido que um osteoclasto pode remover o que é depositado por 100 a 1000 osteoblastos. A Figura 17 mostra esquematicamente as células ósseas.

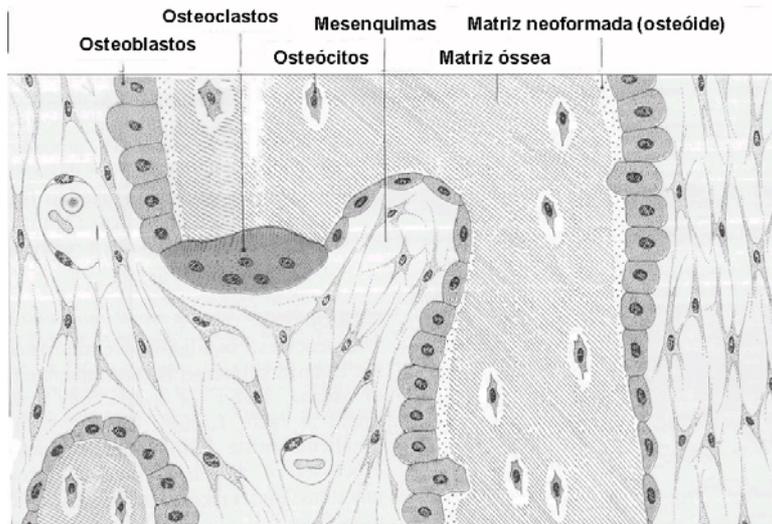


Figura 17 Diagrama das células ósseas(JUNQUEIRA *et al.*, 1995).

II.4.3 NATUREZA DA LIGAÇÃO OSSO-IMPLANTE

Na região que fica em contato com a medula óssea, a resolução do coágulo sanguíneo e a infiltração de glóbulos brancos será seguida pela invasão do sítio cirúrgico, através de uma rede tridimensional de fibrina e colágeno do tipo III (matriz tridimensional), de células endoósseas de fenótipo osteogênico e células mesenquimais indiferenciadas com capacidade para se diferenciarem em células osteogênicas, o que será concomitante com a nova vascularização (DAVIES, 1996). Essas células são pluripotenciais quanto a sua diferenciação em osteoblastos, condroblastos, células musculares ou células de gordura. O caminho seguido dependerá de fatores sistêmicos e locais (REDEPENNING, 1996).

As células interagem com o meio através de proteínas de adesão específicas. As células mesenquimais tendem a usar fibronectina para ancorá-las ao colágeno de sua matriz extracelular. A fibronectina é sintetizada pelas células de origem mesenquimal e está presente no soro do local do trauma cirúrgico. A energia de superfície do material pode influenciar o tipo de proteína que serão aderidas ao material mas o potencial para a proteína sofrer um rearranjo estrutural também é uma variável importante. À medida que a orientação da ligação dos íons, minerais, água, proteínas e outras moléculas é alterada, há uma correspondente mudança na ancoragem de células à superfície via adesão de moléculas celulares, resultando em uma mudança na morfologia e, finalmente, no comportamento das células (REDEPENNING, 1996).

A arquitetura cortical vascular será destruída pelo trauma cirúrgico independentemente da geometria do implante. No córtex, ocorrerá a princípio a necrose do tecido ósseo. Somente através de remodelamento ósseo ocorrerá posteriormente uma substituição do osso peri-implante com a possibilidade de formação de novo tecido ósseo na superfície do implante (DAVIES, 1996).

Existem duas possíveis formas pelas quais as células ósseas migram para a superfície do implante: no primeiro, elas vêm diretamente da trabécula vizinha; no segundo, as células migram através da matriz tridimensional. O primeiro método é o menos provável, já que a trabécula vai estar danificada pelo trauma cirúrgico e a superfície estará coberta com proteínas adsorvidas. No segundo método, ou seja, migração através da rede tridimensional, é preciso que a superfície do implante ancore a rede tridimensional. A ancoragem é necessária para suportar as contrações de tecido que ocorrem quando do remodelamento. Em implantes metálicos, a ancoragem é mecânica, ao passo que acredita-se que ocorra ligação química em implantes recobertos com materiais bioativos, que são ávidos na adsorção de proteínas. O conceito de ligação química não está ainda estabelecido porque é difícil isolar-se o efeito da rugosidade do efeito da composição química das camadas de fosfatos de cálcio (DAVIES, 1996).

Testes *in vitro* mostraram uma ligação íntima dos produtos da matriz extracelular e os substratos de carbonatoapatita, ao passo que observou-se uma interface abrupta entre substrato de hidroxiapatita e esses produtos (DE BRUJIN, 1996).

Acredita-se que a densidade óssea tem um fator preponderante sobre a dissolução da hidroxiapatita (GROSS, 1996). Um dos principais fatores para o sucesso de uma cirurgia de implante é a integridade interface osso-implante. Isso significa boa ligação e transferência de tensões adequada na interface. Vários elementos contribuem para a integridade da interface, como nível e distribuição de tensões, reações teciduais, remodelamento, trauma e cirurgia e movimento relativo entre osso e implante.

Uma análise desses fatores abrange conhecimentos interdisciplinares envolvendo materiais e superfícies, engenharia química e mecânica, aspectos biológicos do meio circunvizinho. Dentre os elementos responsáveis pela obtenção de resultados satisfatórios em uma cirurgia de implante, pode-se citar (KOHN e DUCHEYNE, 1992):

- seleção do material do implante;

- propriedades mecânicas do recobrimento;
- mecanismo de ligação do tecido ao implante;
- o estado superficial do material e/ou recobrimento;
- adesão do recobrimento ao implante;
- tamanho, forma e distribuição da porosidade superficial;
- viabilidade e propriedades mecânicas do tecido circunvizinho;
- estabilidade inicial e estímulo ao tecido que está se formando;
- propriedades elásticas do substrato e do tecido;
- tipo de carregamento;
- geometria do implante;
- resposta biológica do material.

A resposta biológica, no caso de metais, está associada com a posição na tabela periódica e com o peso atômico. Os elementos do Grupo II (Be, Mg, Ca, Cd, Sr, Ba, Zn e Hg) mostram acentuada citotoxicidade, ao passo que os elementos dos Grupos IV (Si, Ti, Zr e Sn) e VI (Cr, Mo e W) não mostram toxicidade nem irritação. Os metais de baixo peso atômico dentro de um grupo possuem alta citotoxicidade, irritabilidade e potencial carcinogênico, ao passo que os metais de maior peso atômico dentro do mesmo grupo são inertes. Exemplo: Cu (Grupo I), V, As e Sb (Grupo V) e Fe, Co e Ni (Grupo VIII) são tóxicos, ao passo que Au (Grupo I), Ta (Grupo V) e Pd e Pt (Grupo VIII) são inertes (KAWAHARA, 1995).

Para exercer um efeito negativo sobre as células, o metal deve estar ionizado. Os metais que se ionizam facilmente, como o titânio, são tolerados porque ocorre a formação de um filme estável de óxido. Os metais preciosos não são adequados para utilização como biomateriais porque geralmente são muito dúcteis e os metais preciosos duros contêm metais tóxicos como Cu, Cd e Zn. A tendência a ionização não corresponde totalmente com a citotoxicidade porque o padrão de resposta celular a metais varia dependendo do tipo de íon e do filme passivo sobre a superfície do metal.

Quanto mais a estrutura molecular de um material se assemelhar ao tecido hospedeiro, mais facilmente ele será dissolvido pelo organismo. Logo, materiais com estruturas moleculares semelhantes a proteínas ou polisacarídeos são facilmente reabsorvíveis. Em estudos de cultura de células em meios de cultura contendo soro, foi observado que as células têm maior molhabilidade em superfícies hidrofílicas do

que em superfícies hidrofóbicas. Esse fato foi atribuído a uma casca de hidrogel que é formada ao redor do citoplasma das células. Esse hidrogel é formado por glicosaminoglicanos, e proteoglicanos. Essa camada deve agir como um material de ligação com a incorporação de uma camada de conformação modificada por lipídios e proteínas do meio que são adsorvidos à superfícies hidrofílicas. Essa forte adesão é atribuída a mudanças que ocorrem na camada sanduíche, que é composta pela camada de conformação e pela matriz extracelular (KAWAHARA, 1995). A Figura 18 ilustra esquematicamente a ligação de uma célula a uma superfície hidrofílica.

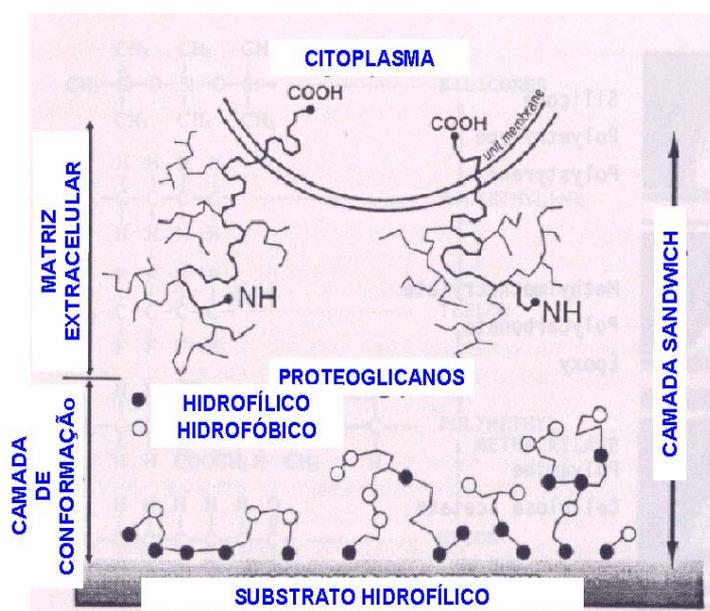


Figura 18 Camada de ligação de uma célula a uma superfície hidrofílica (KAWAHARA, 1995).

A avaliação do contato de células com filmes metálicos em MET revelou que o contato com filmes de titânio se deu de forma direta, ao contrário do que foi observado com outros metais como Au, Pt e Pd, onde observou-se evidência de um espaço entre o citoplasma das células e o metal (KAWAHARA, 1995). Uma explicação para essa observação é que o óxido de titânio adsorve moléculas de água. Essa camada de óxido hidratada (MOOH) adsorve proteínas, lipídios, polisacarídeos proteoglicanos e outras macromoléculas, que são associadas a íons metálicos e não metálicos e são a base para a formação da camada de conformação.

Segundo KAWAHARA (1995), o óxido de titânio está em equilíbrio dinâmico com o tecido ósseo e a ligação desse metal com o tecido é do tipo bioreativa, e não bioativa. Logo, segundo esse autor, a interface Ti-osso produz uma ligação química, situando o

titânio entre os materiais bioinertes e os bioativos. Essa bioreatividade faz com que, em contato com soro sangüíneo, o óxido de titânio sofra uma série de reações. Uma oxidação adicional ocorre, envolvendo a difusão de átomos do metal para a interface óxido/biolíquido. Concomitantemente, a dissolução do óxido é controlada pelos seguintes fatores (BROWNE e MCGREGSON, 1994):

- Natureza e resistência da ligação metal-óxido;
- Espessura do óxido;
- Estrutura de defeitos da camada de óxido (lacunas, elementos intersticiais, etc.);
- Grau de ordenação no interior da camada de óxido;
- Comportamento anisotrópico devido a sítios de dissolução preferencial nos planos cristalográficos específicos.

O óxido de titânio é altamente polar, o que causa a adsorção de moléculas de água e de moléculas solúveis em água. A adsorção dessas moléculas causa a criação de um campo elétrico formado por uma diferença de potencial ao longo da espessura do óxido. Esse campo elétrico encoraja a oxidação do titânio e à medida que a espessura da camada de óxido aumenta, a diferença de potencial diminui, diminuindo também a força motriz para a sua dissolução. Outros eventos envolvem a difusão de íons minerais ou átomos (Ca, P) do biolíquido para o óxido. Ocorre ainda adsorção e desorção de moléculas, sendo que o grau de desorção é dependente da geometria, rugosidade, e do tipo de molécula envolvida (BROWNE e MCGREGSON, 1994).

Quando a interface em questão é a de uma liga de titânio, outras espécies envolvidas devem ser consideradas. No caso da liga Ti-6Al-4V, estudos indicam a presença de Al₂O₃ na camada externa do óxido dessa liga. Estudos termodinâmicos mostram que, em meio aquoso com baixas concentrações de Ca e P, como é o soro humano o alumínio é instável, tendendo a se dissolver (SOARES *et al.*, 1999).

Quando inserido no corpo humano, acredita-se que a interação interfacial do titânio com os fluidos corporais ocorre em três passos (KAWAHARA, 1995):

Passo 1: imediatamente após a inserção, é formado um coágulo ao redor do implante e os tecidos epiteliais e conectivo são ligados à camada hidratada do implante através da camada sanduíche (camada de conformação + matriz extracelular). Essa camada deve estabelecer uma forte ligação entre a superfície do implante e o tecido neoformado.

Passo 2: aproximadamente 1 mês após a inserção do implante em osso alveolar, o coágulo é reorganizado e os osteoblastos entram em contato direto com a superfície via extensões citoplasmáticas.

Passo 3: aproximadamente 3 meses depois, há maior contato direto do tecido ósseo com o implante e as fibras colágenas se ligam intimamente à superfície do implante. Estudos recentes apontam um contato íntimo do tecido ósseo com a superfície de titânio através de uma camada nanométrica que consiste de Ti, Ca, P e macromoléculas.

No caso dos implantes recobertos com cerâmicas bioativas, é formada uma ligação orgânica com o osso neoformado, seguida de osteogênese. Esse fenômeno não ocorre sempre devido à complexidade do fenômeno interfacial de osteogênese. As cerâmicas bioativas sofrem um processo de dissolução resultando na cristalização de apatita *in vivo*.

A engenharia de tecidos pode ser conceituada como a utilização de materiais para promover a formação de novo tecido, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Atualmente, tem-se concentrado estudos na biodegradação do material, já que esse fator influenciará a resposta celular imediata. A engenharia de tecidos requer não somente o recrutamento de células progenitoras adequadas, mas também sua subsequente diferenciação em tecido maduro e funcional. Esses eventos envolvem interações complexas de fatores sistêmicos (hormônios) e locais (citocinas e fatores de crescimento). O campo dos fatores de crescimento tem recebido atenção especial (BOYAN *et al.*, 1996).

II.4.4 TRATAMENTOS DE SUPEFÍCIES

O objetivo dos tratamentos de superfícies é o estabelecimento de uma ligação química e mecânica do osso ao material do implante. Geralmente objetiva-se a criação de uma superfície rugosa onde é feita a aposição mecânica do osso.

A maioria dos implantes sem recobrimento é feita de titânio puro. O metal é usinado até adquirir o formato adequado. Após a usinagem, é feita a limpeza das superfícies para deixá-las livres de resíduos dos processos de fabricação. Esses resíduos podem ser desde lubrificantes de usinagem até partículas de óxido no caso de implantes

jateados. A limpeza é feita com detergentes e banhos ultra-sônicos. KAWAHARA (1995) verificou que o desengorduramento feito com detergente produzia superfícies com alto ângulo de molhamento e baixa tensão superficial crítica, mesmo quando era feita posterior esterilização em autoclave. Por outro lado, tratamentos com ácido e H_2O_2 produziram superfícies com baixo ângulo de molhamento e altos valores de tensão superficial crítica.

Atualmente, uma infinidade de tratamentos de superfícies têm sido aplicados aos implantes de titânio. Esses tratamentos envolvem desde tratamentos puramente mecânicos que visam o aumento da rugosidade superficial até tratamentos químicos que envolvem mudanças estruturais na camada de óxido.

Os três principais métodos de modificação das superfícies dos implantes são (KAWAHARA, 1995):

1. Aplicação de recobrimentos por diferentes métodos: os recobrimentos geralmente são feitos para a criação de uma superfície bioativa. No entanto, outras finalidades como a prevenção da liberação de íons, o mascaramento das contaminações das superfícies causadas pelos processos de fabricação e a produção de uma superfície rugosa e porosa também são objetivados.

2. Tratamentos químicos com ácidos, anodização ou implantação iônica: os tratamentos químicos têm por objetivos principais a limpeza da superfície, criação de rugosidade e ativação da superfície através da alteração estrutural da camada de óxido. Os principais tratamentos químicos são:

- Ataque ácido: os ácidos mais utilizados são HF e HNO_3 . Após o ataque ácido, é feita imersão em solução HF + H_2O_2 . O papel do H_2O_2 é a formação de uma camada estável de óxido, após a exposição do metal ao ácido. Também são aplicados na limpeza após os tratamentos de jateamento para retirar partículas inclusas.
- Anodização: esse tratamento é feito através da utilização de um anodo de titânio e um catodo de platina, prata, aço inoxidável, etc. É feita a reação eletroquímica em um meio eletrolítico e obtêm-se superfícies com diferentes colorações. Em estudo recente, (ISHIZAWA *et al.*, 1995; ISHIZAWA *et al.*, 1996) utilizaram uma solução de acetato de cálcio e β -fosfato de glicerol. Após um tratamento hidrotérmico em

atmosfera de vapor sob alta pressão, foi formada uma camada de hidroxiapatita de aproximadamente 1µm de espessura. Observou-se que essa camada é bastante efetiva na promoção da osteocondutividade, principalmente em implantes rugosos.

Os tratamentos de superfície que envolvem altas temperaturas têm a vantagem de aumentar a espessura da camada de óxido, bem como de estabilizar a mesma. BROWNE e GREGSON (1994) avaliaram a liberação de íons em implantes de liga de titânio com diferentes tratamentos de superfícies. Foi observado que o tratamento térmico a 400°C resultou na formação de uma estrutura rutilica ordenada e densa, que foi efetiva na redução da liberação de íons.

A cristalinidade e a microestrutura do óxido de titânio também influenciam a indução de precipitação de apatita. ISHIZAWA *et al.* (1995) demonstraram a existência de uma dupla camada intermediária entre o substrato de titânio e a camada de apatita precipitada após modificação de uma superfície anodizada.

KOKUBO e colaboradores (KOKUBO *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 1996A; YAN *et al.*, 1996; MIYAZAKI *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 1996B) definiram um tratamento hidrotérmico em solução de NaOH como forma de ativação da superfície do titânio. Dessa forma, é criada uma superfície bioativa intermediária entre a camada de apatita precipitada e a camada de óxido do substrato metálico. O tratamento mais usual consiste na exposição a uma solução alcalina seguido de tratamento térmico. Esse tratamento produz uma camada de um titanato alcalino que, em contato com os líquidos corporais, incorpora íons cálcio e fosfato. A resistência ao cisalhamento da interface metal-apatita em amostras de titânio submetidas a tratamento alcalino seguido de tratamento térmico se mostrou bem superior à dos processos físicos de deposição de hidroxiapatita (KIM *et al.*, 1996B).

A Figura 19 apresenta esquematicamente as etapas da ativação da superfície do titânio através de tratamento químico em solução de NaOH. As etapas de mudança estrutural consistem em:

- (a) formação de uma camada de titanato alcalino hidrogel;
- (b) densificação do gel e transformação em uma fase vítrea de titanato alcalino;
- (c) nucleação de apatita sobre a superfície após inserção em SBF (simulated body fluid).

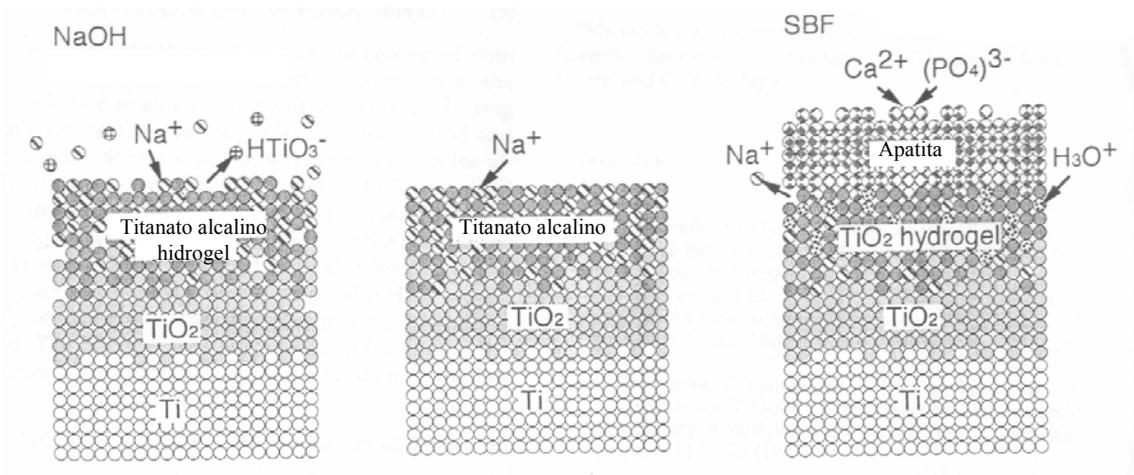


Figura 19 Representação esquemática da evolução estrutural da ativação da superfície do titânio obtida através de tratamento químico em solução de NaOH (SALAYTER e SLAYTER, 1992).

Uma variação do tratamento com NaOH, proposta por WEN *et al.* (1998), consiste em um ataque ácido com HCl e H₂SO₄ seguido de tratamento alcalino com NaOH em ebulição. O ataque ácido tem a função de criar micropóros na superfície do implante. Os autores postulam que o tratamento alcalino tem duas funções: formação de mais micropóros e aumento da camada de óxido.

FUJISHIRO *et al.* (1996) utilizaram um tratamento hidrotérmico para precipitar uma camada de monetita entre o substrato de titânio e o recobrimento de hidroxiapatita. A camada de monetita serviu de intermediária entre a camada de óxido de titânio e a camada de apatita precipitada sobre o implante.

- Nitrificação: há dois métodos para se fazer a nitrificação das superfícies de titânio: implantação iônica ou aquecimento a 750°C-900°C em atmosfera de nitrogênio gasoso. No método de implantação iônica, são usados nitrogênio gasoso e titânio metálico em uma câmara de vácuo para formar TiN. Esse composto intermetálico é implantado sobre a superfície do titânio. O tratamento térmico em atmosfera gasosa também produz uma camada de TiN.

3. Tratamento mecânico por jateamento ou usinagem: os implantes sem recobrimento são submetidos a tratamentos mecânicos que visam a aposição mecânica do tecido ósseo ao implante. Geralmente essa finalidade é alcançada através da criação de detalhes usinados na superfície dos implantes ou através do aumento da rugosidade das superfícies. Os detalhes usinados podem ser desde

superfícies rosqueadas até a criação de furos ou reentrâncias para que o osso cresça por entre esses detalhes. O aumento da rugosidade das superfícies é feito geralmente como o jateamento com partículas duras de óxido. Os óxidos mais usados são óxido de Ti, Al ou Si. Após o jateamento, é recomendado um tratamento com ácido para retirar possíveis incrustações de partículas de óxido e também para uniformizar a rugosidade criada pelo processo de jateamento.

A necessidade do desenvolvimento e manutenção de uma interface osso-implante em função para retenção mecânica e transmissão de forças oclusais tem levado diversos autores a estudar a influência da rugosidade das superfícies de implantes odontológicos na resposta óssea *in vivo* (WENNERBERG *et al.*, 1993; WENNERBERG *et al.*, 1997; WONG *et al.*, 1995; SUZUKI *et al.*, 1997; O, GOTFREDSEN *et al.*, 1995; BRANEMARK *et al.*, 1997) e *in vitro* (KELLER *et al.* 1990; BOYAN *et al.*, 1996; OSHIDA *et al.*, 1993; KIESWETTER *et al.*, 1996; FUJIMORI, 1995). As características de superfície como macro e micro topografia e composição química das superfícies afetam as respostas celulares a curto prazo (migração e ancoragem) e a longo prazo (diferenciação e expressão da matriz) (KELLER, 1998).

Após a limpeza, é feita a esterilização. Esses tratamentos podem afetar a resposta celular. O estado energético das superfícies depende do tipo de material, do manuseio do implante durante o processo de manufatura, do modo de limpeza e de esterilização. Tanto contaminantes orgânicos quanto os inorgânicos podem modificar as propriedades químicas e a energia da superfície (CARLSSON *et al.*, 1989).

Esterilização é definida como a eliminação ou destruição total de toda vida microbiana ou viral. Desinfecção é a redução dos microorganismos patogênicos a níveis seguros através da inibição dos processos celulares (SINGH e SCHAAF, 1989).

O método de esterilização mais utilizado é o de autoclave, que consiste na exposição da superfície a uma atmosfera de vapor aquecido. Esse método promove um aumento da espessura da camada de óxido do titânio. No entanto, a esterilização em autoclave pode promover a adsorção de contaminantes. Segundo KELLER *et al.* (1990), os implantes esterilizados com autoclave apresentaram superfícies mais hidrofóbicas do que os implantes esterilizados com gás óxido de etileno a 130°C ou imersão em etanol absoluto por 20 minutos.

Métodos alternativos têm sido propostos. Dentre eles, irradiação com Raios Gama, esterilização dinâmica com Raios Ultra-Violeta, esterilização por descarga de radiofrequência a plasma e imersão em etanol absoluto, dentre outros.

Estudos laboratoriais indicam que a exposição a fontes de Raios Ultra-Violeta promovem uma inativação de 90% de vírus e bactérias, causando uma desinfecção e não uma esterilização (SINGH e SCHAAF, 1989). O método de esterilização dinâmica consiste na exposição da superfície a ser esterilizada a uma lâmpada germicida especial Ultra-Violeta. Essa lâmpada é capaz de penetrar nos materiais orgânicos, irradiar todas as irregularidades da superfície a ser tratada, causar uma excitação da superfície do titânio e microcombustão de microarestas provenientes do processo de fabricação (DELGADO e SCHAAF, 1990).

A esterilização por descarga de radiofrequência é feita através do bombardeio da superfície com íons formados no plasma. Nesse tratamento, são removidos átomos e moléculas da superfície. Ocorre uma redução da espessura de óxido bem como uma maior limpeza quando comparado com a esterilização em autoclave (CARLSSON *et al.*, 1989; WENNERBERG *et al.*, 1993; BINON *et al.*, 1992).

II.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO METALÚRGICA

As superfícies dos implantes devem ser caracterizadas quanto a sua composição química, quanto à topografia e quanto à bioatividade. As técnicas de caracterização de composição química avaliam o grau de pureza do metal bem como a presença de contaminantes provenientes dos processos de fabricação, limpeza e esterilização. A caracterização da topografia envolve a análise das superfícies com o emprego de várias técnicas de microscopia e perfilometria.

A energia da superfície também é um ponto a ser analisado. Para essa análise, são utilizados goniômetros para medir o ângulo de contato de um líquido colocado sobre a superfície a ser analisada. A energia na superfície de um biomaterial é definida pela densidade geral e pela polaridade das cargas. Assim, superfícies com polaridade positiva ou negativa podem ser hidrofílicas, ao passo que superfícies com cargas neutras podem ser mais hidrofóbicas. O efeito global das cargas nas superfícies é aumentar a tensão superficial local, a energia livre de superfície e a energia de adesão (BOYAN *et al.*, 1996).

II.5.1 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA

WENNERBERG *et al.* (1992) estabeleceram que os detalhes de topografia em escala micrométrica podem ter uma influência sobre as propriedades mecânicas, e de superfície. Para descrever a topografia das superfícies de implantes, várias técnicas são empregadas. As mais utilizadas são (DA SILVA *et al.*, 1998A):

A. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Nessa técnica, um feixe colimado de elétrons varre a superfície da amostra. Os elétrons espalhados são coletados, gerando um sinal que é amplificado e usado para modular o brilho de um tubo de raios catódicos que é varrido simultaneamente ao feixe de elétrons. A imagem gerada é uma imagem ponto a ponto. Como a profundidade de campo é muito grande, essa técnica é muito utilizada em estudos topográficos.

Vários tipos de contrastes podem ser utilizados de acordo com a finalidade da análise. Na análise com contraste por elétrons secundários, são captados elétrons com baixa energia, oriundos da superfície da amostra. Essa particularidade permite a análise de detalhes topográficos com elevada definição. Na análise com contraste por elétrons

retroespalhados, são coletados elétrons de maior energia, oriundos de uma profundidade maior da amostra. Esse contraste é fortemente dependente das espécies atômicas envolvidas. Isso faz com que essa técnica seja potencialmente usada na identificação de fases que não apresentam significantes diferenças morfológicas.

B. MICROSCOPIA ÓTICA CONFOCAL A LASER

Os microscópios confocais, em contraste com as outras técnicas de microscopia ótica, removem a luz não refletida do plano focal. Isso é conseguido através de dois filtros bloqueadores. Se a superfície está em foco, a luz refletida passará pelo filtro e uma alta intensidade será registrada. Em caso contrário, a intensidade registrada será muito baixa. As contribuições de regiões fora de foco para a formação da imagem são efetivamente suprimidas, resultando em uma imagem de alta resolução e alta precisão no plano vertical (WENNERBERG, 1996). No microscópio confocal, podem ser feitas seções confocais, ou seja: imagens de vários planos e através de um “software” adequado, esses planos podem ser montados dando origem a um mapa de alturas tridimensionais. Quando são analisadas amostras transparentes, como amostras biológicas, podem ser analisadas profundidades de alguns décimos de milímetros.

C. MICROSCOPIAS DE VARREDURA COM PONTA DE PROVA

Microscopias de varredura com ponta de prova é um nome genérico para as técnicas de microscopia de varredura que utilizam uma pequena ponta de prova posicionada muito próxima à amostra sob investigação. Essa ponta de prova é usada para medir alguma grandeza que é fortemente dependente da separação amostra-ponta de prova. A ponta de prova varre a amostra e uma imagem do relevo da superfície analisada é gerada.

Os principais tipos de microscopias de ponta de prova são microscopia de varredura por tunelamento e microscopia de força atômica. Outras técnicas são: microscopia de força de fricção, microscopia de varredura por condutância iônica, microscopia de varredura por tunelamento de fótons e microscopia de ressonância magnética.

A topografia dos biomateriais na escala em que ocorrem as interações com células e proteínas (de μm a nm) possui informações que são essenciais na avaliação do desempenho do material em contato com os fluidos corporais. Por exemplo, as

mudanças nas propriedades eletrônicas resultantes de defeitos podem afetar a capacidade de adsorção de proteínas e pequenas moléculas. Na escala das células, a topografia pode afetar a migração, diferenciação e aderência de células. A investigação dos biomateriais com microscopia de ponta de prova é bastante útil na caracterização em escalas nanométricas.

C1. MICROSCOPIA DE VARREDURA POR TUNELAMENTO

O microscópio de varredura por tunelamento foi o primeiro da família dos microscópios de ponta de prova. Seu princípio é baseado no efeito túnel, ou seja: uma ponta de prova muito aguda é colocada a uma distância muito pequena (da ordem de nm) de uma amostra e uma diferença de potencial entre elas é aplicada. A grandeza medida é o fluxo de corrente entre a amostra e a ponta de prova pelo tunelamento quântico. A corrente de tunelamento é fortemente dependente da separação amostra-ponta de prova (DESCOUTS *et al.*, 1995).

Essa técnica revela detalhes atômicos como defeitos e processos de adsorção. Essa técnica tem a vantagem sobre as técnicas de difração de permitir uma observação mais local. No campo de biomateriais, as técnicas de microscopia de varredura por ponta de prova oferecem a vantagem de operarem à pressão ambiente e possibilitar análise em líquidos.

A ponta de prova é montada em um atuador piezoelétrico que é guiado por um módulo de alta voltagem. A ponta de prova pode se deslocar sobre a superfície da amostra fazendo varredura lateral e perpendicular, permitindo um deslocamento tridimensional. A corrente é coletada em um pré amplificador, gerando um sinal de entrada. O sinal de saída é proporcional à diferença entre a corrente medida e um valor de referência. Esse sinal de saída é amplificado e enviado para os eletrodos dos tubos piezoelétricos. Os tubos de cerâmica piezoelétrica se retraem quando a corrente de tunelamento é maior do que o valor de referência, ao passo que esses tubos se alongam quando a corrente medida é menor do que a referência. A corrente de tunelamento é então mantida constante durante a varredura, assim como a distância da ponta de prova à superfície da amostra. Uma imagem tridimensional é gerada através das alturas da ponta de prova em função de sua posição lateral (xy).

C2. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

O microscópio de força atômica permite ao usuário superar a limitação que a microscopia de tunelamento impõe em relação a amostras não condutoras. Também pode-se analisar amostras em ambientes úmidos. Uma ponta de prova é posicionada em uma haste de material macio, que varre a amostra analisada. Um feixe laser incide sobre a parte posterior da haste e, após sofrer reflexão, é defletido em um fotodiodo com dois setores. A diferença de intensidade da luz que alcança os dois setores é uma medida da deflexão do suporte e fornece um sinal que é enviado ao circuito eletrônico. A deflexão é então mantida constante durante a varredura. A varredura é feita com força constante entre a amostra e o suporte. A medida da força de arraste da ponta de prova sobre o substrato pode ser associada, por exemplo, com a força de adesão de células ao substrato. A aproximação da ponta à superfície analisada é menos delicada já que a ponta é suportada por um material macio e evitará dano à amostra (DESCOUTS *et al.*, 1995).

D. PERFILOMETRIA

As análises em perfilometria permitem a quantificação de parâmetros de rugosidade. Essa quantificação é geralmente feita através da utilização de rugosímetros ou de equipamentos desenvolvidos especificamente para esse fim. Os rugosímetros podem fazer a varredura da superfície com uma agulha semelhante às agulhas utilizadas nas técnicas de microscopia de sonda (“probe microscopy”) ou pode também ser feita uma varredura a laser.

WENNERBERG *et al.* (1992) desenvolveram um método de análise de rugosidade que descreve a topografia de superfícies. Esse método emprega uma varredura confocal a laser sobre a superfície de uma amostra que fica a uma distância de trabalho grande. Os principais parâmetros obtidos são:

- Ra, rugosidade média também chamada de média aritmética. É a convenção mais utilizada para rugosidade, especialmente para controle de qualidade e é definida como o desvio médio absoluto da linha média sobre o comprimento varrido. No entanto, Ra é insensível a comprimento de onda ou picos e vales muito altos.
- Rq, rugosidade média quadrática, é o desvio médio sobre o perfil medido no comprimento varrido. É geralmente usado para dar significância teórica extra sobre a distribuição de alturas.
- Rt é o máximo valor medido de distância entre pico e vale sobre o perfil analisado.

II.5.2 TÉCNICAS DE MICROANÁLISE E DE QUÍMICA ANALÍTICA

Quando uma amostra é observada em MEV, as interações do feixe de elétrons com a superfície da amostra geram fótons, elétrons Auger, elétrons secundários, elétrons retroespalhados e emissão de Raios-X característicos. As técnicas de microanálise empregam um detector de Raios-X acoplado ao MEV que os diferencia em termos de energia (EDS) ou comprimento de onda (WDS), sendo mais empregada a espectroscopia por energia dispersiva (EDS). Os Raios-X detectados são comparados aos padrões existentes e os elementos constituintes são identificados. A comparação com padrões pode fornecer uma análise química semi-quantitativa, embora as técnicas de microanálise sejam mais usadas em análise qualitativa.

B. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS POR RAIOS-X (XPS) OU ESPECTROSCOPIA DE ELÉTRONS PARA ANÁLISE QUÍMICA (ESCA)

Dois termos gerais que englobam todas as técnicas que envolvem luz são espectroscopia e espectrometria. O instrumento é designado espectrômetro. Qualquer espectrômetro que utilize um fotomultiplicador como detector é chamado espectrofotômetro e a técnica é designada como espectrofotometria.

Na técnica de XPS, a amostra é atingida por um feixe de Raios-X que ejeta elétrons das camadas de valência. O aparelho, que opera sob alto vácuo, detecta e quantifica a energia associada à transição dos elétrons das camadas mais internas que irão ocupar os lugares vagos. Assim, essa análise se restringe a camadas da ordem de 0,5 a 10nm, podendo fornecer informações a respeito da interação da superfície com o meio, identificando por exemplo os filmes de óxido presentes (DA SILVA *et al.*, 1998A). O elétron ejetado possui energia cinética dada por

$$E_{\text{cin}} = h\nu - E_b - \phi, \text{ onde:}$$

$h\nu$ é a energia do fóton incidente;

E_b é a energia de ligação do elétron emitido;

ϕ é a função de trabalho.

Como tanto $h\nu$ quanto ϕ são conhecidos, pode-se determinar E_b através da medição da energia cinética, identificando-se, assim, os elementos presentes nas superfícies analisadas (MUSTER e DEMRI, 1995).

A espectroscopia de fotoelétrons por Raios-X é uma ferramenta útil na avaliação das mudanças estruturais ocorridas na camada de óxido de titânio quando é feito o tratamento de ativação da superfície (TAKADAMA, 1998).

A espectroscopia de elétrons para análise química é uma ferramenta importante na compreensão das interações entre as proteínas e as superfícies (CHITUR, et al, 1998).

C. ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA COM FONTE DE PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE (ICP-MS)

Há vários métodos através dos quais são gerados átomos a partir de íons. O mais usual é a utilização de uma chama. Quando uma solução de íons metálicos é colocada em uma chama, o solvente evapora deixando cristais do sal anteriormente dissolvidos. A chama é usada para essa atomização na maioria dos instrumentos de absorção atômica, em todas as fotometrias por chama e em todos os instrumentos por fluorescência atômica. Todos os atomizadores são fontes de energia similares. Um tipo de atomizador utiliza uma fonte de plasma acoplada indutivamente. Nesse caso, além da atomização, também ocorre a excitação dos átomos (KENKEL, 1992).

A espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma acoplado indutivamente é uma técnica de emissão estritamente atômica onde uma suspensão da amostra e os padrões, são introduzidas em um fluxo de argônio que irá se ionizar gerando o plasma. Uma intensa emissão ocorrerá levando à possibilidade de detecção e medição de pequenas concentrações de íons metálicos com precisão. Essa técnica é muito mais sensível do que todas as outras técnicas atômicas (KENKEL, 1992).

D. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

A difração de Raios-X pela rede cristalina ocorre sobre uma larga faixa angular quando o comprimento de onda dos Raios-X é da ordem do espaçamento entre planos de átomos. Os Raios-X com uma faixa estreita de comprimento de onda, em uma região adequada para análise por difração, são obtidos nos espectros K dos metais leves,

cromo, cobalto, cobre, ferro, manganês, molibdênio e níquel e cobre uma faixa de 0,7 a 2,2 Å. Os espectros são obtidos pelo bombardeio dos átomos do elemento com elétrons de energia entre 25 e 50 kV. Os Raios-X nessa região são facilmente absorvidos e janelas especiais de berílio ou mica são usadas na porta dos tubos e detectores de Raios-X (MITCHELL, 1996).

O espectro K contém três linhas fortes: α_1 , α_2 e β , sendo que α_1 e α_2 formam uma dupla com estreita separação de comprimento de onda. Os Raios-X podem ser detectados por filme, por um contador ou por um cintilador. Podem ser usados filtros para eliminar efeitos de fluorescência das radiações K e L da amostra analisada.

A difração de Raios-X identificará as linhas de difração correspondentes aos espaçamentos interplanares dos materiais cristalinos. O padrão resultante (espectro), que é composto de espaçamentos planares (no eixo x) e intensidades (no eixo y), pode ser comparado a padrões do Comitê da Junta de Padrões de Difração de Pós (JCPDS) da ASTM para os vários fosfatos de cálcio. Logo, a localização e a intensidade dos picos fornecerão um espectro característico que será utilizado na análise qualitativa. Essa análise identificará a presença de fases cristalinas mas não de fases amorfas nem de baixa cristalinidade (TOTH *et al.*, 1995).

A identificação dos espectros obtidos é normalmente feita usando-se um índice de padrões (espectros), publicado pela ASTM (American Society for Testing and Materials). Nesse sistema, cada pó é caracterizado pelas distâncias interplanares, d , e pelas intensidades, I , das três linhas mais intensas no espectro. São fornecidas a lista completa distâncias interplanares, suas intensidades relativas, índices dos planos cristalográficos, parâmetros de rede e constantes físicas do composto analisado.

A difração de Raios-X também permite que se faça análise quantitativa das fases presentes em uma amostra. No entanto, essa análise não é trivial e vai depender da cristalinidade e da diferença dos coeficientes de absorção das espécies envolvidas. Uma outra limitação é que devem ser preparadas curvas de calibração das espécies em questão, com os cristais distribuídos em direções aleatórias, sem orientação preferencial.

A análise por difração de Raios-X serve, dentre outras razões, para medir a dissolução, composição e estabilidade de recobrimentos com cerâmicas bioativas. Uma outra aplicação é a medição de parâmetro de rede, particularmente importante

quando se está estudando as apatitas com substituições iônicas, já que muitas vezes essas substituições causam variações nos parâmetros de rede.

Para uma análise de rotina do pó a difração de raios-x nos dá a seguinte informação sobre o composto:

identidade: cada composição estrutura cristalina tem seu conjunto de picos de difração próprios para ângulos de difração específicos;

pureza: se o composto consiste de uma única fase ou mistura de fases;

cristalinidade refletindo o tamanho ou perfeição do cristalito derivado do alargamento do pico de difração;

tamanho e forma aproximados: a forma qualitativa, se longo ou equiaxial, podem ser deduzidas;

parâmetros de rede: que juntos com análise química indica o tipo e soma de substituição na estrutura;

orientação.

Embora muitas informações possam ser obtidas pela difração de raios-X, a combinação com outros tipos de técnicas apresenta uma visão mais ampla das propriedades físico-química da hidroxiapatita biológica ou sintética. As propriedades de várias hidroxiapatitas, biológicas como sintéticas, têm sido obtidas utilizando-se a difração de raios-X e a espectroscopia no infravermelho.

Método Rietveld

O método Rietveld é um método de refinamento estrutural e não um método de determinação estrutural embora constituindo, no entanto, uma parte importante no contexto da caracterização estrutural.

O método Rietveld utiliza os espectros de difração e tem como característica fundamental a adoção de um modelo adequado ao estudo a realizar, permitindo extrair dos espectros de difração informações detalhadas da estrutura cristalina e informações analíticas dos materiais.

O difratograma de determinada substância é constituído por um conjunto de reflexões individuais, função intrínseca do seu agrupamento atômico, possuindo determinado perfil, cujas características são: altura, posição, largura, forma e área, sendo esta última proporcional à intensidade de Bragg, I_k , em que k representa os índices de Miller (h, k, l), e I é proporcional ao quadrado do valor absoluto do fator de estrutura $|F_k|$, dependente da natureza dos átomos.

O modelo estrutural adotado por Rietveld inclui vários tipos de parâmetros (Park, 1980):

Parâmetros da estrutura cristalina: coordenadas (x,y,z) da posição dos átomos na célula unitária, deslocamentos vibratórios dos átomos, densidade ocupacional das posições atômicas, dimensões (a,b,c) da célula unitária e ângulos (α,β,γ) entre os vetores.

Parâmetros do perfil das reflexões: largura das reflexões, assimetria e forma.

Parâmetros globais: função do fundo que engloba o comprimento de onda (α_1, α_2) e o zero da escala 2θ .

Parâmetros da intensidade: inclui o fator de escala, que ajusta a altura de todas as reflexões do espectro calculado às do espectro observado.

Parâmetro de correção da orientação preferencial dos cristalitos da amostra.

Estes parâmetros, permitem calcular, através do algoritmo, um espectro modelo adequado à fase que pretendemos estudar, o qual é comparado com o espectro observado e a diferença entre ambos minimizada fazendo variar os parâmetros no modelo estabelecido, utilizando o processo de minimização baseado no princípio dos mínimos quadrados até que o melhor ajuste seja obtido entre o padrão de difração observado experimentalmente e o cálculo de acordo com um modelo que envolve a estrutura cristalina, fatores instrumentais e características da amostra. A quantidade minimizada no refinamento por mínimos quadrados é o resíduo S_y (AOKI, 1988):

$$S_y = \sum_i \frac{(y_i - y_{ci})^2}{y_i} \quad (2.1)$$

onde i representa todos os passos em 2θ e y_i e y_{ci} são as intensidades observadas e calculadas no passo i , respectivamente. Esta operação chama-se refinamento estrutural. O cálculo de y_{ci} é resultado da soma de contribuições calculadas a partir das reflexões individuais de Bragg, mais a linha de base. As reflexões individuais são calculadas levando-se em consideração um perfil de reflexões ϕ , que aproxima os efeitos das características do instrumento e da amostra (alargamento dos picos por diminuição dos tamanho de grão) no padrão de difração. O perfil mais indicado para o refinamento de difratogramas de materias nanocristalinos é o chamado Thomas-Cox-Hastings (TCH), resultando de uma mistura dos perfis gaussiano e lorentziano. As larguras das componetes gaussiana e lorentziana do perfil TCH são dadas, respectivamente, pelas expressões:

$$\Gamma_G = \left(U \tan^2 \theta + V \tan \theta + W + \frac{Z}{\cos^2 \theta} \right)^{1/2} \quad (2.2)$$

$$\Gamma_L = X \tan \theta + \frac{Y}{\cos \theta} \quad (2.3)$$

onde U, V, W, X, Y e Z são coeficientes a serem ajustados de acordo com padrão de difração observado experimentalmente.

Em geral, alargamento da linha de difração em razão de microdeformações residuais tem uma dependência angular da forma $\tan \theta$, enquanto a correspondente dependência angular do tamanho de grão é dada pela fórmula de Scherrer e é da forma $1 / \cos \theta$ (HENCH e POLAK, 2002).

O refinamento simultâneo de fases múltiplas é mas um passo para derivar medidas quantitativas das quantidades relativas presentes. Este é o melhor método disponível para análise de fase quantitativa que pode refinar, no processo, um bom modelo estrutural para cada fase. As vantagens principais são que todas as reflexões, e não só um subconjunto, são consideradas e há avaliação entre a melhor quantificação e a melhor das estimativas da contribuição de cada reflexão de Bragg a cada ponto dos dados observados.

Hill e Howard (1987) publicaram a primeira demonstração completa de análise quantitativa de fases com o método Rietveld. No caso deles, estavam com os dados de difração de nêutron. Eles mostraram que existe uma relação simples entre os fatores de escala determinados em refinamento de Rietveld de amostras de múltipla fase e a quantidade de fase:

$$W_p = \frac{S_p (ZMV)_p}{\sum_i [S_i (ZMV)_i]} \quad (2.4)$$

onde:

W_p é a fração molar de cada fase;

S é o fator de escala;

Z é o numero de unidades da fórmula por célula unitária;

M é a massa de célula unitária;

V é o volume da célula unitária.

E. ESPECTROSCOPIA DE ELÉTRONS AUGER

A incidência de um feixe de elétrons sobre a superfície de um metal gera uma série de interações. Dentre elas, a absorção de Raios-X, que pode decair como fluorescência (fótons de mais baixa energia) ou elétrons Auger, na faixa de 50eV. Esses elétrons são retirados de regiões próximas à superfície da amostra, tornando a técnica particularmente aplicável a análises de superfícies (SLAYTER e SLAYTER, 1992).

Nessa técnica, é feito um bombardeamento iônico prévio a fim de limpar a superfície antes da análise ser realizada. Uma outra vantagem desse bombardeio é que sucessivas camadas atômicas podem ser arrancadas permitindo uma análise em diferentes profundidades.

F. ESPECTROMETRIA DE TRANSFORMADA DE FOURIER POR RAIOS INFRA-VERMELHOS (FTIR) e Raman (FT-Raman)

A absorção de radiação Infra-vermelha causa transições de níveis vibratórios de energia das moléculas. A utilização dessa técnica reside no fato de que somente comprimentos de onda muito específicos de luz Infra-vermelha podem ser absorvidos quando um determinado tipo de molécula está no caminho da radiação. A absorbância *versus* o comprimento de onda fornece uma “impressão digital” da molécula. As bandas, na região das radiações Infra-vermelhas, são bastante estreitas e são associadas a uma ligação covalente particular na molécula (KENKEL, 1992).

Os instrumentos modernos são projetados para desempenhar a mesma função dos instrumentos dispersivos. No entanto, não utilizam monocromador dispersor de luz e o espectro é obtido muito mais rapidamente. O feixe de luz não-dispersa passa pela amostra e todos os comprimentos de onda e seus correspondentes dados de absorção são recebidos no detector simultaneamente. É feita uma manipulação matemática (transformada de Fourier) nesses dados para se obter os dados de absorção para cada comprimento de onda individual.

As espectroscopias de transformada de Fourier por Raios infra-vermelhos (FTIR) e transformada de Fourier Raman (FT-Raman) fornecem um detalhamento espectral devido à eliminação da fluorescência dos tecidos naturais e dos materiais sintéticos. Essa eliminação é conseguida com um laser próximo do espectro do infra-vermelho (Nd:YVO₄). A utilização de interferômetros e de transformada de Fourier permite a obtenção dos espectros em tempos mais curtos, aumento do sinal e maior precisão. Ambas as técnicas fornecem informações sobre as vibrações moleculares e são técnicas complementares (REHMAN, 1995A). As técnicas de FTIR e FT-Raman são reconhecidas como técnicas analíticas para aplicações biomédicas porque requerem uma preparação de amostras mínima e porque são técnicas não destrutivas.

Os espectros Raman de amostras de osso revelam picos bem definidos associados a fases orgânicas e inorgânicas. Esses resultados permitem a confirmação de que o osso é formado por uma matriz mineral e uma matriz orgânica. Na técnica de

espectroscopia Raman convencional, é necessário fazer-se a desproteinização do osso para aumentar-se as informações da fase mineral do osso (REHMAN, 1995B).

As pesquisas no sentido de se associar as fases minerais do osso com hidroxiapatita sintética estão em andamento. Em estudo recente, REHMAN e BONFIELD (1995) demonstraram a possibilidade de obtenção de bons detalhes de espectros de infra-vermelho usando a técnica de espectrometria FTIR fotoacústica. Nesse estudo, foram analisados os espectros da fase inorgânica do osso cortical, de hidroxiapatita sintética implantável e de carbonato-apatita sintética. Dos espectros, foram obtidos os dados mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 Posições das bandas de infra-vermelho observadas para as amostras analisadas (REHMAN e BONFIELD, 1995).

Localização dos picos cm^{-1}	Osso humano	Osso de carneiro	Carbonato apatita	Hidroxiapatita comercial (P120)
Extensão de hidroxila	--	--	3569	3568
Carbonato v3	1650-1300	1650-1300	1650-1300	1650-1300
----(m)	1609	1609	1649	1648
----(m)	1473	1471	1470	1454
----(m)	1420	1419		1419
Fosfato v3	1190-976	1190-976	1190-976	1190-976
(vs)	--	1096		1092
(s)	--	1085	--	--
(m)	--	1056	--	--
(vs)	1046	--	--	1042
(w)	--	1012	--	--
Fosfato v1 (m)	961	960	960	962
Carbonato v2 (ms)	874	873	873	874
Fosfato v4	660-520	660-520	660-520	660-520
(m)	--	--	--	633
(vs)	605	601	603	602
(vs)	565	579	567	566
Fosfato v2 (w)	467	470	469	472
----(vw)	445	454	--	--

Pela Tabela 7, pode-se observar que o osso humano e o osso de carneiro apresentam resultados quase idênticos. A carbonato apatita sintética tem um espectro próximo ao do osso humano, ao passo que há uma série de diferenças entre os espectros da hidroxiapatita pura e o da carbonato apatita. A diferença mais marcante é o decréscimo no pico de hidroxila localizado em 3568 cm^{-1} , enquanto a hidroxiapatita pura tem picos bem definidos nessa posição. A hidroxiapatita pura possui uma banda de hidroxila em 624 cm^{-1} , que está ausente na carbonato apatita (REHMAN e BONFIELD, 1995).

II.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

A identificação de características das superfícies que influenciam as interações com as células e com os microconstituintes dos fluidos corporais tem sido realizada através dos testes *in vitro*. Embora a avaliação de como um implante irá se comportar *in vivo* não possa ser completamente realizada através dos resultados de uma análise *in vitro*, essas técnicas fornecem informações valiosas e apresentam algumas vantagens como a possibilidade de se isolar a variável de superfície específica, rapidez, simplicidade, reprodutibilidade, quantificação e custo. A limitação principal é que nunca se consegue reproduzir a biodiversidade que um implante fica sujeito quando inserido dentro de um organismo vivo. MASUDA *et al.* (1998) listou algumas vantagens e desvantagens oferecidas por estes testes:

VANTAGENS:

- O sistema é reprodutível e existe uma sequência de eventos bem determinada;
- possibilidade de isolamento de variáveis;
- Possibilidade de utilização de métodos de avaliação da adesão, proliferação e diferenciação;
- As células podem crescer em áreas relativamente extensas, fornecendo bastante material para análise.

DESVANTAGENS:

- Dificuldades de se analisar materiais opacos;
- Os meios de cultura requerem suplementos, que podem alterar o comportamento das células, mascarando os resultados;
- Ausência das forças biomecânicas existentes *in vivo*;
- Ausência da resposta inflamatória, neovascularização e interação com outros tipos de células.

Dependendo do tipo de investigação que se tem em mente, existem vários modelos de testes *in vitro* para se estudar as propriedades biológicas dos materiais. As informações obtidas serão particularmente úteis como uma etapa preliminar à realização dos testes *in vivo*.

Os teste *in vitro* são, em geral, estáticos e não levam em consideração a dinâmica do implante *in vivo*. Esses fatores tais como posição anatômica do material (por exemplo, maxila versus mandíbula ou tíbia versus crânio), comprimento do dispositivo, carga

(direção e intensidade), fadiga e desgaste do material, alterações no meio e no material e idade do paciente, são todas considerações importantes que não podem ser feitas *in vitro*. Adicionalmente, os modelos de cultura de células tendem a examinar a resposta de tipos simples de células, geralmente linhagens transformadas e, portanto, devem ser interpretados com cautela.

Os principais testes *in vitro* são os testes em líquido corporal simulado (SBF) e os testes de cultura de células. Os testes de cultura de células podem avaliar o efeito do material sobre as células no que se refere à multiplicação, função, toxicidade e adesão. Há uma variedade de métodos de avaliação de toxicidade. No entanto, os materiais não tóxicos não são necessariamente biocompatíveis, o que torna necessária a realização de outros testes. Nos testes de cultura de células, é observado como células mantidas em cultura interagem com as superfícies. Esses testes têm a vantagem de indicarem não somente a bioatividade, mas também a toxicidade das superfícies analisadas.

II.6.1 TESTES EM LÍQUIDO CORPORAL SIMULADO

Esse tipo de teste consiste em submeter a superfície de um implante ao contato com um líquido que simula os líquidos corporais. A principal solução utilizada é a solução de KOKUBO. (SBF, SBF (K-9), KOKUBO SOLUTION) Após imersão em SBF, a superfície do implante é analisada por técnicas de análise de superfície como MEV, difração de Raios-X em baixo ângulo, AFM e FTIR.

Esses testes são chamados testes de bioatividade porque avalia-se a precipitação ou não de carbonato apatita a partir da solução SBF. Quando ocorre essa precipitação, o material é considerado bioativo.

OHGUSHI *et al.* (1996A) e OHGUSHI *et al.* (1996B) reportaram a influência da precipitação de apatita *in vitro* sobre a diferenciação de células em osteoblastos. Segundo esses autores, estudando a precipitação de apatita sobre superfícies vitro-cerâmicas, a transformação da superfície é um fenômeno essencial para o estabelecimento de uma ligação óssea satisfatória. Esse efeito foi também reportado por vários autores estudando modificações em superfície de de titânio (LIVIN e KAPLAN, 1996; ISHIZAWA *et al.*, 1996; FUJISHIRO *et al.*, 1996; WEN *et al.*, 1998) ou tântalo (MYIAZAKI *et al.*, 1996).

II.6.2 CULTURA DE CÉLULAS

O processo de formação de osso novo é complexo e envolve a interação de uma grande variedade de células e condições de superfícies. As células mesenquimais são capazes de se diferenciar em osteoblastos quando em presença de concentrações de fatores de crescimento. Logo, a presença e a concentração desses fatores de crescimento nos primeiros estágios da recuperação do coágulo pode desempenhar um papel importante no tipo de células recrutadas para o local, influenciando a resposta biológica a longo prazo (KIESWETTER *et al.*, 1996).

Dependendo do local de implantação, outros fatores locais ajudam a determinar a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, condroblastos ou fibroblastos. Por exemplo, se o local for bem oxigenado, a osteogênese é favorecida, ao passo que baixa oxigenação favorece a condrogênese. A presença de micromovimentos pode levar a formação de fibrocartilagem. Quando a topografia da superfície favorece a vascularização, a osteogênese pode ocorrer, ao passo que em locais onde é difícil o crescimento de vasos, a condrogênese é mais provável. O tipo de rugosidade também determinará o número e tipos de ancoragens focais das células com seu substrato. Observa-se que em superfícies rugosas, as células formam camadas que cobrem os vales entre os picos (BOYAN *et al.*, 1996). As células osteogênicas são os osteoblastos e os condroblastos. Uma medida da capacidade osteoindutora dos materiais bioativos é a diferenciação de células precursoras nessas células (OHGUSHI *et al.*, 1996B).

Segundo MASUDA *et al.* (1998), os materiais cerâmicos e metálicos não são verdadeiramente osteogênicos, isto é: não são capazes de induzir a formação de osso novo pelo recrutamento ou estímulo de células precursoras dos osteoblastos. Esses materiais não são, portanto, osteoindutores, ou seja, não têm a capacidade de induzir a formação de osso novo. As superfícies podem ser osteocondutoras, ou seja, podem ser favoráveis ao crescimento de capilares e células precursoras dos osteoblastos. Ainda é necessário um maior detalhamento no estudo das interações moleculares e celulares que ocorrem nas superfícies dos implantes *in vivo*.

As células usam a morfologia do substrato para a migração e orientação. Células epiteliais e fibroblastos se alinham ao longo de ranhuras que podem ser feitas propositalmente nas superfícies. Esse processo de alinhamento é chamado de orientação por contato. O espaçamento e a profundidade das ranhuras têm um papel

importante sobre a orientação por contato. Como as células epiteliais, os osteoblastos também têm sensibilidade à morfologia das ranhuras de um material. Os osteoblastos têm preferência por póros de 200 a 400nm para encorajar a migração, ancoragem e proliferação (BOYAN *et al.*, 1996).

KELLER (1998) associou diferenças na morfologia e adesão de osteoblastos a substratos metálicos à diferença de rugosidade de uma ordem de grandeza. KIESWETTER *et al.* (1996) estudaram a modulação da rugosidade sobre a produção local de fatores de crescimento e citocinas por células MG-63. Esses autores observaram que a rugosidade afeta a proliferação, diferenciação e produção da matriz de células MG-63, bem como a produção de citocinas e fatores de crescimento. Foi observada uma menor proliferação celular nas superfícies mais rugosas bem como diferenças na morfologia quando comparada a superfícies lisas. Esse resultado foi associado a um estágio mais avançado de diferenciação, que é precedido por uma queda na proliferação.

As interações entre as células e os biomateriais é favorecida pela adsorção de proteínas às superfícies. Os recobrimentos com fosfatos de cálcio têm a vantagem de facilitar esse processo de adsorção. Dentre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita (Ca/P=1,67) é o que tem maior capacidade de adsorver proteínas a sua superfície (TAKASHIMA *et al.*, 1996).

Dentre as proteínas não colágenas produzidas pelos osteoblastos, a osteocalcina, também chamada de proteína Gla óssea (BGP), é a proteína mais abundante da matriz óssea. A fosfatase alcalina (ALP) se localiza na membrana celular das células osteogênicas. Esses marcadores bioquímicos são indicadores da capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos (OHGUSHI *et al.*, 1996B).

A. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

Os testes de citotoxicidade utilizam a resposta celular ao material a ser testado inserido em um meio de cultura. O contato das células com o material pode ser de três tipos: direto, indireto ou extração.

A1. CONTATO POR EXTRAÇÃO

No método por extração, são utilizados veículos de extração para retirar amostras do material a ser testado. Os veículos utilizados são: água destiladas, solução salina, saliva artificial, líquido corporal simulado e meio de cultura com soro. Também são usados solução de cloreto de sódio, óleos vegetais, de acordo com a norma ASTM F619-79. Solventes, reagentes químicos, água e óleo não podem ser utilizados em meio de cultura.

Não existe um único método de extração que simule o aspecto real do material no organismo. Segundo NAKAMURA et ali (1995) , o método de extração mais eficiente é o método dinâmico que utiliza esferas girantes de alumina. Os métodos dinâmicos de extração são uma boa alternativa. Esses métodos têm as seguintes vantagens:

- Uma carga dinâmica pode ser aplicada sobre um material que é usado sob tensão como carga oclusal ou atrito;
- A extração contínua previne o decréscimo da taxa de extração causado pelo acúmulo de produtos na interface;
- O processo de extração pode ser acelerado;
- Uma extensão do processo permite o estudo de aspectos detalhados do material ao longo do tempo.

A2. CONTATO INDIRETO

Nesse método, é utilizada uma camada intermediária entre uma monocamada de células cultivada no fundo de um frasco de cultura de células e o material testado. Essa camada funciona como uma tela, sendo o material mais comumente utilizado o Agar fluido. Pode-se usar ainda um gel de colágeno ou um filto de acetato. (NAKAMURA et ali, 1995)

A3. CONTATO DIRETO

O método de contato direto consiste em colocar amostras do material no topo de uma monocamada de células ou em semear as células sobre a superfície da amostra.

Uma variação consiste em se colocar um gradiente de concentração da amostra no meio de cultura. A intensidade da toxicidade do material é avaliada observando-se o

aspecto das células ao longo do gradiente de concentração da amostra. Um material de alta toxicidade afetará células em regiões de baixa concentração.

Dentre as desvantagens do métodos de contato direto estão:

- Oos materiais solúveis em água tendem a se dissolver muito;
- Quando o equilíbrio for estabelecido, haverá um decréscimo na liberação de substâncias, havendo um aumento da concentração adjacente à amostra. Essa característica é inerente aos métodos estáticos;
- O efeito do meio de cultura não representa a realidade. Dessa forma, as células incubadas sobre teflon não aparecem bem aderidas. No entanto, isso é um problema da superfície do material, não indicando que este seja tóxico.

B. AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA

A microscopia eletrônica de varredura tem sido utilizada rotineiramente para avaliação da morfologia das células sobre as superfícies dos biomateriais.

As primeiras observações das interações de células com substratos indicaram que estas se dão através de membranas franzidas, adesões focais, placas de adesão e, mais recentemente, contatos focais. Os contatos focais são microestruturas especializadas apoiadas dentro das células que se projetam para os microfilamentos que ficam sob a membrana citoplasmática. Originalmente, foi proposto que os contatos focais deveriam ter um certo comprimento para garantir adesão e contato máximo das células com o substrato. Mais recentemente, se sugere que o espraiamento não é sempre compatível com a diferenciação das células mesenquimais, particularmente no caso da condrogênese (BOYAN *et al.*, 1996).

C. AVALIAÇÃO DA ADESÃO

Existem vários métodos de avaliação da adesão de células aos substratos. Um método utiliza a observação em MEV da morfologia dos processos celulares ancorados às superfícies (HING *et al.*, 1999; NAKAMURA, *et al.*, 1995). Outros métodos empregam a medição das forças requeridas para retirar as células do substrato. Isso pode ser obtido através da utilização de um micromanipulador, de uma centrífuga, ou de um fluxo hidrodinâmico (“flow cell”).

D. AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO E PROLIFERAÇÃO

Durante a replicação celular, o ácido desoxi-ribonucleico (DNA) é replicado. A síntese do DNA pode ser marcada com timidina tritiada ($[^3\text{H}]\text{-RdR}$), que é seletivamente incorporada ao núcleo celular durante o ciclo celular. No entanto, tanto o DNA quanto a incorporação de $[^3\text{H}]\text{-RdR}$ podem ser medidas para monitorar a proliferação celular (HUANG, 1997).

E. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR

A detecção bioquímica da atividade de fosfatase alcalina é um indicador sensível da atividade dos osteoblastos. Tanto a produção quanto a liberação da fosfatase alcalina podem ser medidas nos lisados celulares e/ou no meio de cultura.

A razão ALP/DNA é um indicativo da quantidade de atividade de fosfatase alcalina por célula. Segundo HUANG (1997), a variação causada pelas diferenças de formato das amostras pode ser eliminada por essa aproximação.